

**Struktur- og aktivitetsstudier av
polysakkarider isolert fra
*Syzygium guineense***

Etnofarmakologiske studier i Mali



**Anders Rusten
Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
2006**

**Struktur- og aktivitetsstudier av
polysakkarider fra *Syzygium guineense***

Etnofarmakologiske studier i Mali

**Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo**

**Anders Rusten
Oslo, november 2006**

Veiledere:

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Drissa Diallo

Forord

Denne hovedoppgaven ble gjennomført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, UiO og ved Département de Médecines Traditionnelles, Mali i perioden november 2005 – november 2006.

Jeg ønsker å takke min veileder, professor Berit Smestad Paulsen, for gode råd og veiledning underveis i oppgaven, samt for å være både nyttig og veldig hyggelig reisefølge i Mali.

Jeg vil også og takke min veileder, professor Drissa Diallo, for god veiledning på laben på DMT, og for den vel gjennomførte jobben som tolk, intervjuer og reiseleder ved feltarbeidet i Mali.

Medveileder Kari Inngjerdingen fortjener en takk for teoretisk, praktisk og moralsk støtte.

Ellers ønsker jeg å takke Marit Inngjerdingen, Torun A. Liljebäck, Terje E. Michaelsen og Finn Tønnesen for håndsrekning, veiledning, rådgivning og rettledning.

Oslo, november 2006

Anders Rusten

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
1. Forkortelser	6
2. Sammendrag	8
3. Innledning	11
3.1. Polysakkarider.....	11
3.2. Plantens cellevegg.....	11
3.2.1. Oppbygning og funksjon	11
3.2.2. Cellulose.....	12
3.2.3. Hemicellulose.....	12
3.2.4. Pektiner.....	13
3.2.4.1. Arabinaner.....	14
3.2.4.2. Arabinogalaktaner Type I og II.....	15
3.2.4.3. Rhamnogalakturonan	16
3.3. Biologisk aktivitet.....	17
3.3.1. Komplementsystemet	17
3.3.2. Struktur-aktivitetsforhold	19
3.3.3. Makrofager og makrofagaktivering.....	20
3.4. Syzygium guineense (Willd.) DC	22
3.4.1. Taksonomi.....	22
3.4.2. Botanikk	22
3.4.3. Tradisjonell bruk	24
3.4.4. Tidligere forskning.....	24
4. Oppgavens målsetning	25
5. Metoder og materialer	26
5.1. Generelle metoder	26
5.1.1. Vannkvalitet	26
5.1.2. Innveiging.....	26
5.1.3. Sentrifugering.....	26
5.1.4. Filtrering.....	26
5.1.5. Avgassing/evakuering av luft.....	27
5.1.6. Volumreduksjon	27
5.1.7. Vask av dialyseslanger	27
5.1.8. Dialyse.....	28
5.1.9. Blanding av løsninger.....	29
5.1.10. Frysetørring	29
5.1.11. Syrevask av glassutstyr	30
5.1.12. pH-måling.....	30
5.1.13. Absorbansmåling.....	30
5.2. Isolering av polysakkarider.....	31
5.2.1. Preparering av tørket plantemateriale.....	31
5.2.2. Diklormetaneekstraksjon.....	31
5.2.3. Metanolekstraksjon	31
5.2.4. Vannekekstraksjon	32
5.2.5. Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow	33
5.2.6. Gelfiltrering.....	36
5.2.6.1. Bio-Gel® P-6 DG	36
5.2.6.2. Sephacryl S-400	38

5.2.6.3.	PD-10	39
5.3.	Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinnhold	40
5.3.1.	Metanolyse	40
5.3.2.	TMS-derivatisering	41
5.3.3.	Gasskromatografi	42
5.3.4.	FPLC – Superose 6	43
5.3.5.	Fenolsvovelsyretest	45
5.4.	Strukturoppklaring	46
5.4.1.	Enzymatisk degradering	46
5.4.2.	Metylering	47
5.4.2.1.	Karboksylsyre-reduksjon	47
5.4.2.2.	Metylering	49
5.4.2.3.	Hydrolyse	51
5.4.2.4.	Reduksjon	52
5.4.2.5.	Acetylering	53
5.4.3.	Bestemmelse av eddiksyre- og metanolinnhold	54
5.5.	Biologisk aktivitet	56
5.5.1.	Komplementfikseringstest	56
5.5.2.	Måling av NO-frigjøring fra makrofager	60
6.	Resultater og diskusjon	62
6.1.	Isolering av polysakkarider	62
6.1.1.	Ekstraksjon	62
6.1.2.	Gelfiltrering – Bio-Gel® P-6 DG	62
6.1.3.	Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow	63
6.1.4.	Gelfiltrering – Sephacryl S-400	64
6.2.	Karbohydratanalyse	66
6.2.1.	Monosakkaridanalyse	66
6.2.2.	Bindingsforhold	68
6.2.3.	Molekylvektsdistribusjon	71
6.2.4.	Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold	74
6.3.	Biologisk aktivitet	75
6.3.1.	Komplementfiksering	75
6.3.2.	Makrofagstimulering	78
6.4.	Strukturoppklaring ved enzymatisk degradering	79
6.4.1.	Enzymatisk degradering	80
6.4.2.	Karbohydratsammensetning	80
6.4.3.	Bindingsforhold	81
6.4.4.	Biologisk aktivitet	83
7.	Etnofarmakologiske studier i Mali	84
7.1.	Etnofarmakologi	84
7.2.	Mali	84
7.3.	Tradisjonell medisin i Mali	85
7.4.	Feltarbeid	86
7.4.1.	Healerintervjuer i Kolokani	86
7.4.2.	Healerintervjuer Dioila	89
8.	Konklusjon	94
9.	Referanser	96

1. Forkortelser

AG I	Arabinogalaktan type I
AG II	Arabinogalaktan type II
APC	Antigenpresenterende celler
Ara	Arabinose
DCM	Diklormetan
DEAE	Diethylaminoetyl
DMT	Département de Médecines Traditionelles
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FSS	Fenolsvovelsyretest
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC/MS	Gasskromatografi/massespektrometri
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming
MAC	Membranangrepskompleks
MBL	Mannosebindende lektin
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NED	N-(1-naptyl)etylendiamin
PM II	<i>Plantago major</i> fraksjon II
RG I	Rhamnogalakturonan type I
RG II	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
Sg100A3	Lavmolekylær fraksjon isolert fra Sg100A etter gelfiltrering på Sephacryl S-400
Sg100N	Nøytral fraksjon isolert fra Sg100 etter separasjon på DEAE Sepharose® Fast Flow
Sg100N1	Nøytral fraksjon isolert fra Sg100N etter gelfiltrering på

	Sephacryl S-400
Sg50 og Sg100	Fraksjoner isolert fra hhv. SgC50 og SgC100 etter desalting på Bio-Gel [®] P6 DG
Sg50A og Sg100A	Sure fraksjoner isolert fra hhv. Sg50 og Sg100 etter separasjon på DEAE Sepharose [®] Fast Flow
Sg50A1 og Sg100A1	Høymolekylære fraksjoner isolert fra henholdsvis Sg50A og Sg100A etter gelfiltrering på Sephadex S-400
Sg50A1E og Sg100A1E	Enzymdegraderte fraksjoner isolert fra henholdsvis Sg50A1 og Sg100A1 etter desalting på PD-10-kolonne
Sg50A2 og Sg100A2	Mellommolekylære fraksjoner isolert fra henholdsvis Sg50A og Sg100A etter gelfiltrering på Sephadex S-400
SgC50 og SgC100	Råekstrakt etter hhv. 50 °C og 100 °C vannekstraksjon
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
Xyl	Xylose

2. Sammendrag

Tradisjonell medisin er en svært viktig del av helsetilbudet i Mali og mange andre land verden over. Tradisjonelle healere har stor kunnskap om bruk av tradisjonell medisin som er tillært og overlevert gjennom generasjoner. *Syzygium guineense* (Willd.) DC er tradisjonelt brukt mot blant annet diaré, magesmerter og til sårheling. Det er sterke indikasjoner på at mange polysakkarider fra planter kan ha immunmodulerende effekt på mennesker. Screening-undersøkelser av *S. guineense* har blant annet vist effekt på humant komplementsystem og videre studier av struktur-aktivitetsforhold er derfor interessant.

Tørkete, pulveriserte blader fra *S. guineense* ble ekstrahert med organiske løsemidler for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Ved vannekstraksjon ved 50 °C og 100 °C ble polysakkaridene isolert i råekstraktene SgC50 og SgC100. Fraksjonene ble videre opprenset på Bio-Gel[®] P6 DC til Sg50 og Sg100. Videre opprensing ble gjort på DEAE Sepharose[®] Fast Flow til de sure fraksjonene Sg50A og Sg100A, samt den nøytrale fraksjonen Sg100N. Gelfiltrering på Sephacryl S-400 ble gjennomført for videre separasjon av fraksjonene. Dette ga Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1, Sg100A2, Sg100A3 og Sg100N1. Sg50A1 og Sg100A1 ble enzymatisk degradert med endopolygalakturonanase og etterfølgende separasjon på PD-10-kolonne ga fraksjonene Sg50A1E og Sg100A1E.

Monosakkaridsammensetning ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Bindingsforhold ble analysert ved karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse. Molekylvektsdistribusjon ble bestemt ved FPLC. Analyse av metanol- og eddiksyreinhold ved hjelp av HPLC. Aktivitet i biologiske systemer ble undersøkt ved komplementfikseringstest og måling av NO-utskillelse fra makrofager.

Alle sure fraksjoner inneholdt typiske pektiske monosakkarider. Disse fraksjonene hadde også mange forgreningspunkter som tyder på komplekse polysakkarider, med stor andel såkalte hårete områder.

Høy forekomst av Gal-enheter er sammen med terminal og 1,5 bundet Ara typisk for AG II og Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1 og Sg100A3 inneholder trolig store og komplekse slike områder bestående av rhamnogalakturonanhovedkjeder med AG II-sidekjeder av nøytrale Gal- og Rha-enheter.

Flere av fraksjonene fra *S.guineense* viste likhetstrekk med B2IIc, en sur fraksjon isolert fra *Bupleurum falcatum*. Sg100A2 og Sg100A3, med svært høyt innhold av GalA og betydelige mengder Gal, Rha og Ara hadde flere likhetstrekk med B2IIc og har trolig langt større homogalakturonanområder enn de andre fraksjonene.

Sg100N1 inneholder trolig store arabinanområder som sannsynligvis er eller har vært bundet til galaktaner.

Sg50A hadde en heterogen molekylvektsdistribusjon bestående av to hovedfraksjoner distribuerer rundt 548 kDa og 35,8 kDa. Sg100A var mer homogen og viste én klar topp i kromatogrammet distribuert rundt 45,9 kDa.

Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold for Sg50A og Sg100A viste et eddiksyreinnhold på henholdsvis $> 16,5 \%$ og $> 1,2 \%$ i forhold til totalt GalA-innhold. Metanolinnhold lot seg ikke bestemme da metoden viste seg uegnet.

Av rækstraktene viste SgC50 høyest aktivitet i komplementfikseringstesten, høyere enn PM II-standard benyttet. Aktiviteten av SgC100 lot seg ikke skille fra PM II, selv om ICH_{50} var noe høyere enn for standarden. Dette var for øvrig samsvarende med aktivitet for Sg50A og Sg100A, der Sg50A viste betydelig høyere aktivitet enn PM II, mens Sg100A og Sg100N viste tydelig lavere aktivitet. Sg50A1, Sg50A2 og Sg100A1 viste høyere aktivitet i komplementfikseringstesten enn PM II og de andre fraksjonene etter gelfiltrering på Sephacryl S-400. Høyere aktivitet ble sett for Sg50A1 og Sg100A1 enn Sg50A2.

Både Sg50A og Sg100A viste tydelig doseavhengig aktivitet med hensyn til makrofagstimulering, Sg50A høyere enn Sg100A.

Fraksjonene Sg50A1 og Sg100A1 som gjennomgikk enzymatisk degradering med endopolygalakturonanase viste små endringer i monosakkaridsammensetning og bindingsforhold. Aktiviteten for begge fraksjoner sammenlignet med PM II i komplementfikseringstesten var lavere etter degradering.

45 healere i Kolokani- og Dioila-området ble intervjuet med hensyn til medisinsk bruk av *S.guineense*. I Kolokani var det kun to av 16 healere som brukte planten. Dekokt av blader ble brukt mot malaria, smerte og uvelhet. Rot var forsøkt brukt som afrodisium. I Dioila brukte 19 av 39 healere planten. Av 29 indikasjoner var sår, dermatose og malaria hyppigst nevnt. Blader var hyppigst brukt, foran stammebark og rot.

3. Innledning

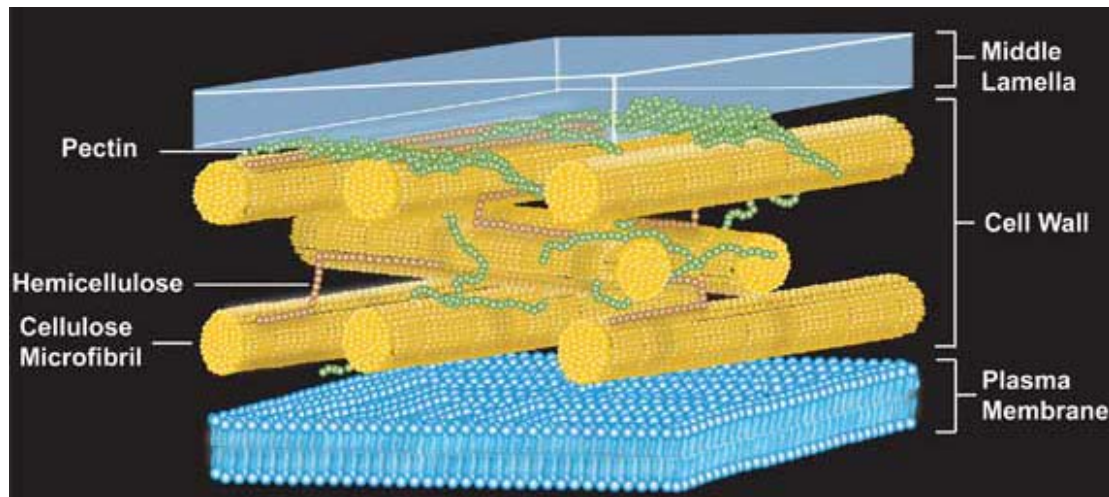
3.1. Polysakkarider

Karbohydratpolymerer bygget opp av mer enn 10 monosakkaridenheter og bundet med glykosidbindinger kalles polysakkarider. Polysakkarider er viktige bestanddeler i alle levende organismer. Forskjellige typer polysakkarider har forskjellige egenskaper og derfor forskjellige funksjoner. I planter for eksempel, fungerer cellulose som strukturell støtte, mens stivelse fungerer som energilager. Polysakkarider kan være homogene, dvs. bestå lange kjeder med kun én karbohydratmonomer, eller de kan være heterogene, dvs. bestå av ulike typer monosakkarider. Monomere i et polysakkarid er bundet sammen på forskjellige måter, noe som gir både rette kjeder og forgrenete mer kompliserte strukturer. Dette er, i tillegg til hvilke type monosakkarider polysakkaridet er bygget opp av, av stor betydning for molekylets egenskaper og funksjon (Bruneton 1999)

3.2. Plantens cellevegg

3.2.1. Oppbygning og funksjon

Planteceller har en cellevegg på utsiden av plasmamembranen hvis hovedfunksjon er å stive av cellen og holde naboceller sammen (Taiz og Zeiger 2002). Celleveggen består i de fleste tilfeller av tre lag; primærvegg, sekundærvegg og midtlamelle (Smith 1999). Primærveggen er i hovedsak oppbygd av pektiner og hemicellulose og dannes hos voksende celler, noe som medfører at den er lite spesialisert og ofte relativt lik for ulike celler. Sekundærveggen ligger innerst av de tre lagene og dannes hos ferdig utviklede celler noe som gjør den ofte er mer spesialisert enn primærveggen. Den er, i tillegg til å ha noe høyere innhold av cellulose og hemicelluloser, noe stivere (Smith 1999). Både primær- og sekundærveggen er stivet opp av et nettverk av cellulosemikrofibriller. Midtlamellen er tynn og har høyt innhold av pektiner. Den ligger ytterst av de tre lagene (Taiz og Zeiger 2002). Figur 3.1 oversikt over strukturen av en typisk plantecellevegg med de viktigste strukturelle komponentene.



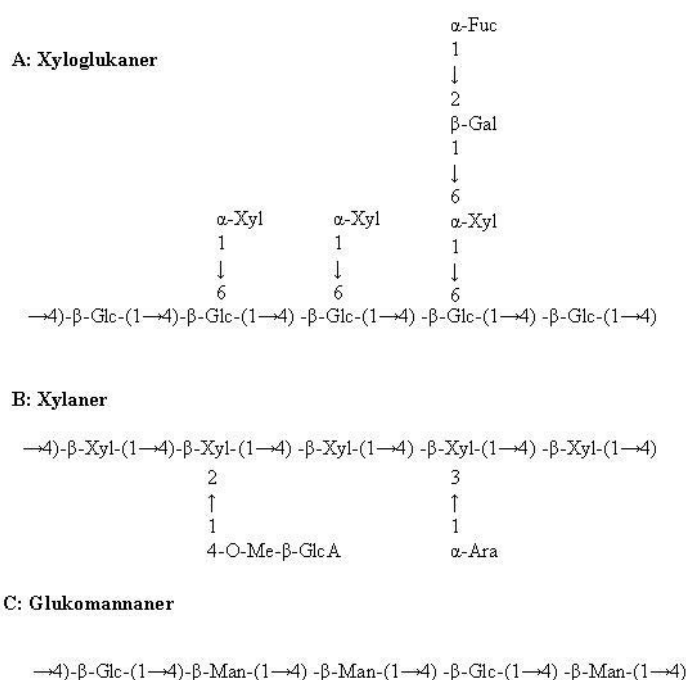
Figur 3.1 *Plantecellevegg (Sigma-Aldrich)*

3.2.2. Cellulose

Cellulose er et homogent, lineært polysakkarid bestående av β -(1 \rightarrow 4) D-Glc. Ved hjelp av hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner danner cellulosemolekyler ordnete krystallinske strukturer som bidrar til avstiving av celleveggene. Disse strukturene kalles mikrofibriller (Figur 3.1). På grunn av stor motstandsdyktighet mot enzymatisk degradering og den dårlige vannløseligheten er cellulose stabile molekyler i plantecellevegger (Taiz og Zeiger 1998).

3.2.3. Hemicellulose

Hemicellulose er en samlebetegnelse på en gruppe heterogene polysakkarider som binder mikrofibrillene av cellulose i plantecellevegger sammen. Gruppen består blant annet av glukomannaner, xylaner og xyloglukaner som vist i Figur 3.2 (Taiz og Zeiger 1998).

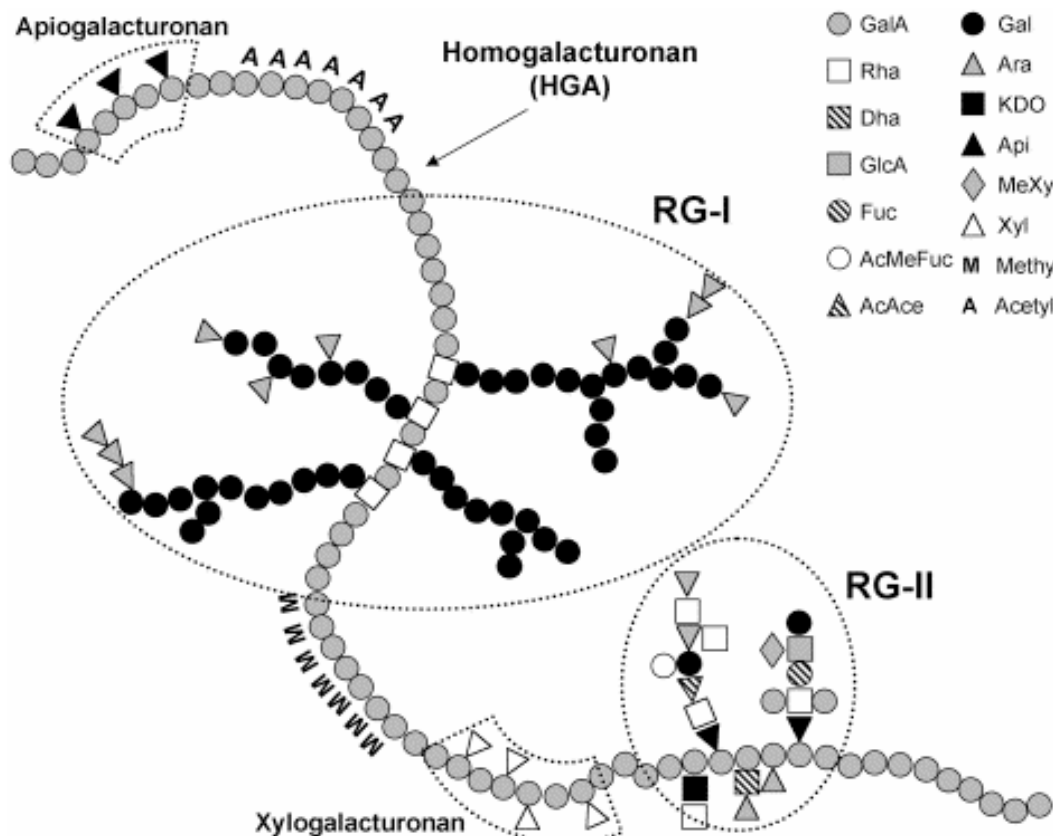


Figur 3.2 Eksempler på vanlige hemicelluloser: xyloglukaner (A); xylaner (B); og glukomannaner (C) (Taiz og Zeiger 1998)

Xyloglukaner (Figur 3.2A) består av (1→4)-bundne β-D-Glc-enheter med sidekjeder av Xyl, Gal og noen ganger terminal Fuc. Xylaner (Figur 3.2B) har hovedkjede av (1→4)-bundet β-D-Xyl med GlcA- og Ara-enheter bundet i henholdsvis C-2 og C-3. I glukomannaner (Figur 3.2C) består hovedkjeden av β-(1→4) bundne Glc- og Man-enheter. Sidekjeder av Man bundet i C-6 kan forekomme (Smith 1999).

3.2.4. Pektiner

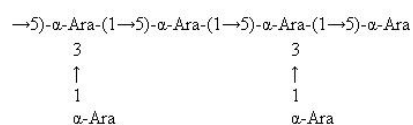
Pektinsyre, eller pektiner, er et fellesbegrep brukt til å beskrive polymerer bestående av en α-(1→4) D-GalA-kjede. Tidligere ble det trodd at de kun inneholdt syrer, men etter hvert har det kommet frem at pektiner er en svært kompleks gruppe polysakkarider. Pektiner inneholder ofte lange sekvenser med polygalakturonaner, det vil si homogalakturonan i tillegg til nøytrale monosakkarider (Figur 3.3). I planter finner man ofte pektiner mellom celler og i primærceleveggen (Figur 3.1). Pektiner har, ved tradisjonell bruk i forskjellige kulturer, vist seg ansvarlig for forskjellige former av bioaktivitet (Paulsen og Barsett 2005).



Figur 3.3 Foreslått skjematisk fremstilling av pektin (Perez, et al. 2003)

Pektiner er gode geldannere og lett løselige i vann og kan derfor lett ekstraheres fra celleveggen ved hjelp av varmt vann. Karboksylgruppene på GalA-enhetene foreligger ofte forestret *in vivo*, noe som vanskeliggjør kryssbinding til Ca^{2+} og dermed reduserer evnen til geldannelse (Taiz og Zeiger 1998). Pektiner kan inntil i hovedgrupper: nøytrale og sure polysakkarider. Enkelte strukturelle trekk er felles for begge gruppene og disse diskuteres i de etterfølgende avsnittene (Paulsen og Barsett 2005).

3.2.4.1. Arabinaner



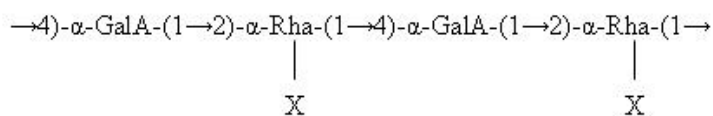
Figur 3.4 Foreslått struktur av et arabinan (Taiz og Zeiger 1998)

(1→3)-bundet galaktanhovedkjede og er forgrenet i C-6 med sidekjeder av 1,6 Gal med terminal Ara. AG II er lett løselig i vann (Paulsen og Barsett 2005, Yamada og Kiyohara 1999). Både AG I og II finnes ofte bundet til rhamnogalakturonan I-komplekset. Man kan enkelt skille disse ved at AG II feller ut og danner rødt bunnfall ved reaksjon med såkalt Yariv-reagens, mens AG I holder seg i løsning (Paulsen og Barsett 2005, Taiz og Zeiger 1998).

3.2.4.3. Rhamnogalakturonan

Rhamnogalakturonaner deles normalt inn i to hovedgrupper, rhamnogalakturonan type 1 (RG I) og type 2 (RG II). RG I (Figur 3.6) er store og komplekse molekyler bestående av områder med alternerende Rha- og GalA-enheter med nøytrale sidekjeder og uforgrenede områder av homogalakturonan. I forgrenete områder, ofte kalt hårete, er Rha som regel forgreningspunkt og sidekjedene består hovedsakelig av AG II, men AG I forekommer også (Paulsen og Barsett 2005, Taiz og Zeiger 1998).

Rhamnogalakturonan I



Figur 3.6 Hårete område av RG I. Sidekjedene, X, består ofte av AG II (Taiz og Zeiger 1998)

RG II er del av pektinkomplekset i celleveggen som kun utgjør en liten del av totalmengden pektin (Paulsen og Barsett 2005). RG II har hovedsakelig GalA-enheter i hovedkjeden, mens sidekjedene ofte er langt mer kompliserte enn i RG I. I tillegg til Ara og Gal, består sidekjedene av mer uvanlige sukkerenheter som apiose, fukrose og 3-deoksy-manno-oktulosonsyre (Smith 1999).

3.3. Biologisk aktivitet

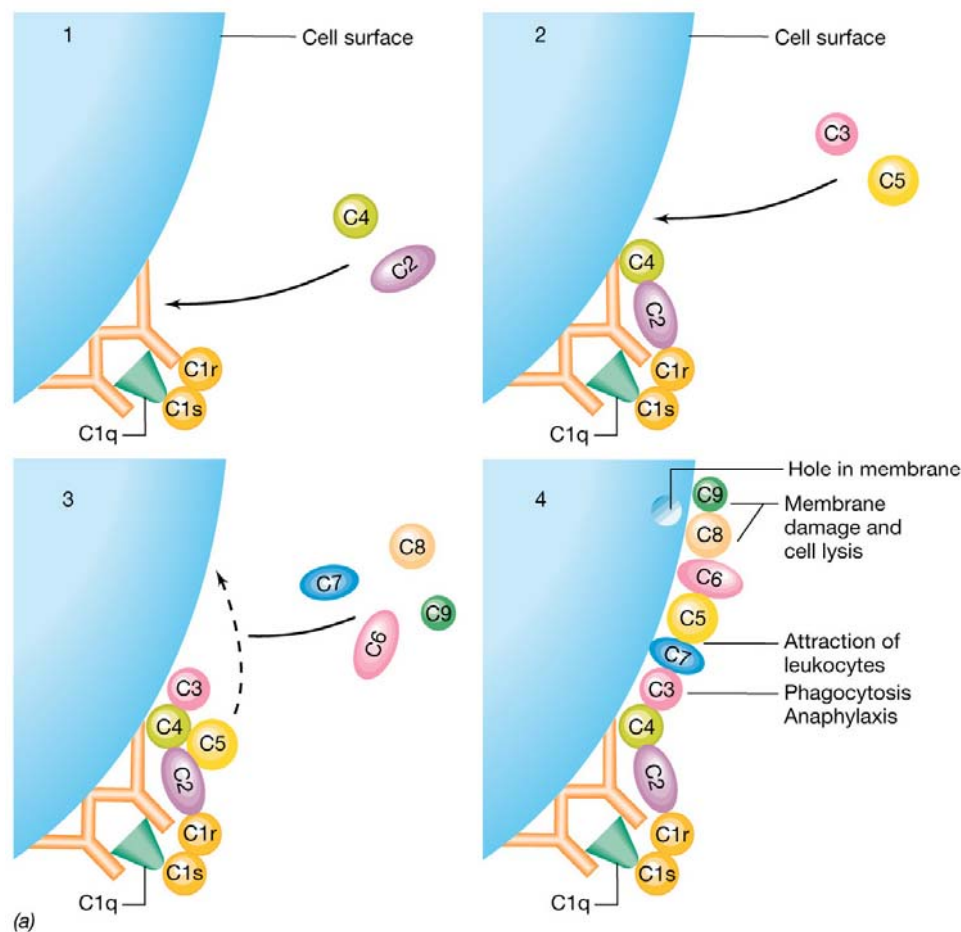
Mange pektiner isolert fra planter, sopp og bakterier de siste årene har vist farmakologisk aktivitet (Yamada og Kiyohara 1999). For polysakkarider fra en rekke planter er effekt på det humane immunsystem vist. Eksempler på dette er: *Plantago major*, *Panax ginseng*, *Glinus oppositifolius* og *Glycyrrhiza uralensis* (Paulsen og Barsett 2005). Effekt på immunsystemet har ofte vært vist ved hjelp av komplementfikseringstesten, som har vist seg å være en god indikator på polysakkariders immunmodulerende effekt. Andre *in vitro* bioassays, som bl.a. måler effekt på makrofager, T-lymfocytter og NK-celler, er også benyttet (Paulsen 2001).

3.3.1. Komplementsystemet

Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet og spiller en viktig rolle i human immunrespons. Komplementsystemet består av en serie proteiner som aktiveres ved interaksjon med antigen-antistoffkomplekser. Denne aktiveringen medfører en kaskadereaksjon som involverer en rekke komplementproteiner og som endelig fører til lyse av bakterier. Komplementproteiner bidrar også til forbedret fagocyttingjennelse og ødeleggelse av antigener (Madigan, *et al.* 2003).

Mange av proteinene i komplementsystemet har enzymatisk aktivitet. Disse aktiveres i en bestemt sekvens av antigen-antistoffkomplekser på bakterier og forårsaker membranskade og lyse eller lekkasje av celleinnhold. IgG- og IgM-klasse antistoffer binder antigener på celleoverflaten, dette komplekset gjenkjenner C1q og andre C1-enheter og dette igjen forårsaker aktivering og binding av videre komplementproteiner i kaskaden. Hovedtrinnene i komplementsystemet er beskrevet i Figur 3.7.

Initieringen (1) etter kobling av antistoff til antigen skjer ved binding av C1 til antistoff-antigenkomplekset. Dette fører til binding av C2 og C4 og aktivering og tilknytning av C3 og C5 (2). Membranbundet C3 katalyserer dannelse av C5-C6-C7-komplekset (3) som sammen med C8 og C9 danner membranangrepskomplekset (MAC). MAC forårsaker membranskade og cellelyse (4). Det er kun gramnegative bakterier som kan lyses ved komplementaktivering. (Madigan, *et al.* 2003).

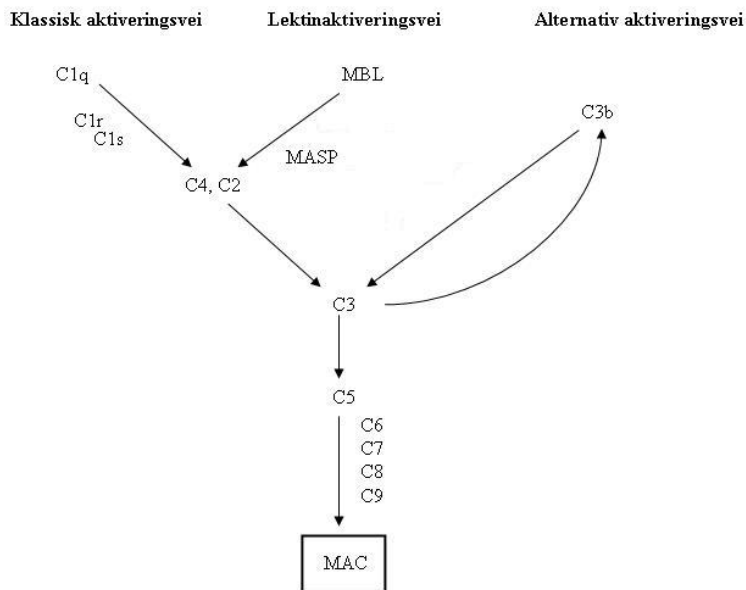


Figur 3.7 Hovedtrinnene i komplementaktivering. Initiering (1), binding av C2-C5 (2), C5-C6-C7-komplekset dannes (3), membranskade og cellelyse (4) (Madigan, et al. 2003)

Når komplementproteiner bindes til overflaten av en celle, øker sjansen for fagocytose av cellen. Dette fordi de fleste fagocytene, inkludert makrofager og B-celler, har C3-reseptorer (C3R) i tillegg til antistoffreseptorer. Vanlige fagocytprosesser forsterkes av antistoffbinding og forbedres ytterligere ved komplementfiksering (C3). Denne prosessen som øker sjansen for fagocytose kalles opsonisering og kan også forårsake skader på grampositive bakterier (Madigan, et al. 2003).

Komplementsystemet kan aktiveres gjennom tre forskjellige mekanismer: den klassiske; lektin-; og den alternative aktiveringsveien (Figur 3.8). I den klassiske aktiveringsveien trengs IgG og IgM for aktivering og denne er derfor en del av den forsinkede immunresponsen siden disse må dannes. Den alternative aktiveringsveien utnytter at det til enhver tid dannes noe komplementprotein C3b som vilkårlig binder seg til celler og bakterier. På fremmede celler fungerer C3b som et opsonin og

fremmer fagocytose. Lektinaktiveringsveien er ikke avhengig av antistoff, men benytter seg av deler av den klassiske aktiveringsveien. Akutfasereaktanten, mannosebindende lektin (MBL), kan binde seg til Man på overflaten av mikroorganismer og dermed aktivere mannosebindende lektin-serinprotease (MASP) som igjen går inn og aktiverer komplementproteinene i den klassiske aktiveringsveien (Lea 2000).



Figur 3.8 Oversikt over komplementsystemets tre aktiveringsveier: klassisk; lektin-; og alternativ aktiveringsvei.

3.3.2. Struktur-aktivitetsforhold

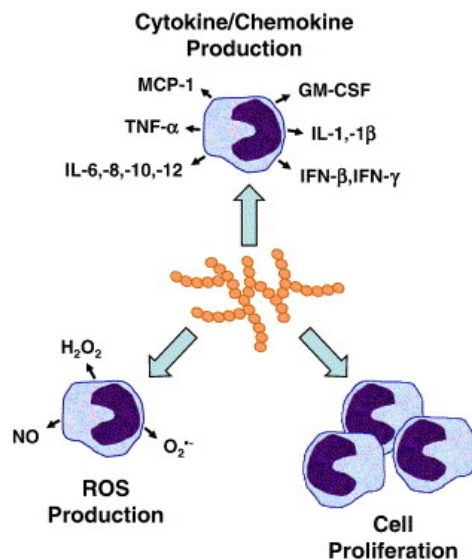
Hårete områder av pektiner synes viktige for komplementaktivering, siden disse har vist aktivitet etter avspaltning fra glatte områder. Hårete områder fra rhamnogalakturonaner har vist seg å aktivere både den klassiske og den alternative veien i komplementsystemet. I tillegg til de hårete områdene kan det tyde på at homogalakturonanområdene har komplementmodulerende egenskaper (Hokputsa, *et al.* 2004, Nergård, *et al.* 2005, Yamada og Kiyohara 1999). β -(1 \rightarrow 3)-galaktan med (1 \rightarrow 6)-galaktooligosakkraridsidekjeder synes å være et minimum for biologisk aktivitet for arabinogalaktaner. I tillegg er typen nøytral sidekjede trolig også viktig. Både metylforestring og forgrening i galakturonanområder hemmer aktiviteten i hårete områder. Dette kan tyde på at tredimensjonal struktur og molekylvekt kan

påvirke komplementaktiveringen (Kiyohara, *et al.* 1997, Nergård, *et al.* 2006, Yamada og Kiyohara 1999). Yamada *et al.* (1986) beskrev også at O-acetylerede polysakkarider kan forhindre klassisk aktivering av komplementsystemet, mens karboksylsyre ansees som essensielt for alternativ aktivering.

3.3.3. Makrofager og makrofagaktivering

Makrofager er spesialiserte hvite blodceller som finnes i store mengder i vev og lymfeknuter og utgjør en viktig del av menneskets ikke-spesifikke immunforsvar. Makrofager hører til gruppen fagocytter, hvis hovedoppgave er å innta og ødelegge patogener. Makrofager er store celler festet på vevsoverflater som, i tillegg til å fagocyttere, bidrar til det spesifikke immunforsvaret ved blant annet å fungere som antigenpresenterende celler (APC). T-hjelpecelle type 1 (T_H1 -celle) aktiveres ved å interagere med antigen presentert på makrofagens overflate. Dette fører til frigjøring av cytokiner som bl.a. stimulerer makrofager til økt fagocytose og fremmer inflammatorisk respons (Madigan, *et al.* 2003). Makrofager er i tillegg involvert i prosesser som vevsremodellering, sårtilheling og hematopoese (Schepetkin og Quinn 2006).

Flere studier har gjennom årene vist at stoffer fra bakterier og encellede sopparter kan ha potente makrofagmodellerende egenskaper (Fujihara, *et al.* 2003, Heumann og Roger 2002). Interessen for å undersøke tilsvarende effekter fra planter har økt mye de siste årene og en rekke plantederiverte polysakkarider har vist å ha positive farmakologiske effekter relatert til modulering av makrofagfunksjon. Blant effektene kan nevnes cytokinfrigjøring, dannelse av reaktive oksygenspecies (ROS) og økt leukocytproliferasjon (Figur 3.9) (Schepetkin og Quinn 2006).



Figur 3.9 Polysakkarider stimulerer en rekke makrofagresponser. Forkortelser: IL, interleukin; IFN, interferon; TNF- α , tumor nekrosefaktor α ; GM-CSF, granulocyt/makrofag koloni-stimulerende faktor; MCP-1, monocytt kjemoattraktant protein-1; NO, nitrogenoksid (Schepetkin og Quinn 2006).

Trolig medieres plantepolysakkariders makrofagaktivering først og fremst ved spesifikke overflatereseptors gjenkjennelse av polymerene. Reseptorene beskrives ofte som mønstergjenkjennende og kan kjenne igjen og binde fremmede ligander i initieringsfasen av immunresponsen (Gordon 2002). Man kan tenke seg at makrofager binder botaniske polysakkardier og/eller glykoproteiner vha Toll-lignende reseptorer 4 (TLR4), CD14, C3R, scavenger-reseptorer, og dektin-1- og Man-reseptorer. Aktivering av disse reseptorene fører til intracellulære signalkaskader som bl.a. resulterer i produksjon og frigjøring av inflammatoriske cytokiner (Schepetkin og Quinn 2006).

3.4. *Syzygium guineense* (Willd.) DC

3.4.1. Taksonomi

Rike:	<i>Plantae</i>
Divisjon:	<i>Magnoliophyta</i>
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i>
Underklasse:	<i>Myrtanae</i>
Orden:	<i>Myrtales</i>
Familie:	<i>Myrtaceae</i>
Slekt:	<i>Syzygium</i>
Art:	<i>Syzygium guineense</i> (Willd.) DC

3.4.2. Botanikk

Syzygium guineense (Willd.) DC (Figur 3.10 og Figur 3.11) vokser, avhengig av vekstvilkår, både som busk og tre og kan bli opptil 35 m høyt. *S.guineense* vokser i skogområder i nærheten av innsjøer og elver opptil 2 500 m.o.h.. Geografisk forekommer planten fra Senegal i vest, til Somalia i øst og Sør-Afrika i sør, det vil si store deler av tropisk Afrika (Tesfaye, *et al.* 2002). Som tre vokser *S.guineense* med rak stamme med omkrets på opptil én meter. Stamme og grener på buskene er i større grad krokete og vokser langs bakken. Plantens frukt er nær sfærisk i formen og om lag 1,25 cm i diameter. Frukten ansees i de fleste områder som spiselig (Burkhill 1997).



Figur 3.10 *Blader fra S.guineense.*



Figur 3.11 *Eksemplar av S.guineense i Dioila, Mali.*

3.4.3. Tradisjonell bruk

S.guineense har tradisjonelt et svært bredt medisinsk bruksområde. Tabell 3.1 viser en oversikt over tradisjonell medisinsk bruk av *S.guineense*.

Tabell 3.1 Tradisjonell bruk av *S.guineense* (Burkhill 1997, Djoukeng, et al. 2005, Niare 2006).

Indikasjon/bruksområde	Plantedel	Tilberedning	Område
Styrkende tonic	Bark	Dekokt i bad eller drikk	Burkina Faso
Magesmerter, diaré	Bark		
Hoste, astma, halsproblemer		Drikkes som te	Kongo
Revmatisme	Bark og rot	Dekokt	Tanzania
Avførende	Bark	Dekokt	Senegal
Magesmerter ved graviditet	Bark og blader	Dekokt	Senegal
Mot sterilitet, abort, gulfeber, koma			Burkina Faso
Mot parasitter	Bark		Burkina Faso
Sår	Blader		Sierra Leone
Mot diaré (astringerende egenskaper)	Bark, rot og blader		Tanzania
Levercirrhose, revmatisme, diaré	Bark	Dekokt	Mali

3.4.4. Tidligere forskning

Det er tidligere gjort begrenset med arbeid på *S.guineense*. Djoukeng *et al* (2005) har testet antibakteriell aktivitet for triterpener fra planten. Asiatsyre (asiatic acid) og terminolsyre (terminolic acid) viste signifikant aktivitet mot *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Shigella sonnei*.

Tsakala, Penge og Kutunina (1996) undersøkte *in vitro* antibakteriell aktivitet av vannløselig tørrekstrakt fra stammebark. Barken ble tørket, knust og ekstrahert med vann ved 100 °C. Råekstraktet ble testet og aktivitet ble vist mot noen stammer av *Salmonella enteridis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia Coli* og *Enterobacter aerogenes*. Ekstraktet viste ingen aktivitet mot *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* og *Klebsiella pneumoniae*.

Det er tidligere også vist antioksidantegenskaper og komplementfikserende aktivitet av vannekstrakt fra blader. Det er funnet store mengder steroler, triterpener og tanniner i bladene, i tillegg til mindre mengder flavonoider, antrakiner og saponosider (Niare 2006).

4. Oppgavens målsetning

Denne hovedoppgaven hadde følgende overordnede mål:

Det skulle utføres studier på polysakkarider fra *S.guineense*, der polysakkaridene skulle isoleres og karakteriseres med hensyn på karbohydratinnhold og struktur. I tillegg skulle biologisk aktivitet studeres og struktur-aktivitetsforhold i biologiske systemer skulle vurderes.

Det skulle gjøres etnofarmakologiske studier i Mali. Healerintervjuer i ulike områder av landet skulle gjennomføres for å samle informasjon om medisinsk bruk av *S.guineense*, der hensikten var å få økt kjennskap til tradisjonell bruk av planten.

5. Metoder og materialer

5.1. Generelle metoder

5.1.1. Vannkvalitet

Destillert vann benyttes til alle metoder hvis annet ikke er presisert

5.1.2. Innveiting

Analysevekt: Sartorius BP 221S

Overskålsvekt: OHAUS PORTABLE Advanced
AND EK-400H

5.1.3. Sentrifugering

Christ 901 (FHI)

CP Centrifuge (Beckmann) (FHI)

KUBOTA KS-8000

5.1.4. Filtrering

Gasbind (kokt 10 minutter i destillert vann for å fjerne cellulose)

Glassfiberfilter: Rundfilter Glasfaser no. 110 og 90 mm (Scheicher og Schüll)

Membranfilter: Millex® GS – Syringe Driven Filter Unit 0,22 µm sterile
(Millipore)

Millex® AA – Syringe Driven Filter Unit 0,8 µm (Millipore)

Millex® AA – Syringe Driven Filter Unit 0,5 µm (Millipore)

Acro® 50A Device with 0,45 µm HT Tuffryn® Membrane
(PALL Gelman Laboratories)

Acro® 50A Device with 5 µm Versapore® Membrane (PALL
Gelman Laboratory)

Nutsj og vakuumpopsats ble benyttet for større væskemengder og sprøyte med filterenhet for mindre mengder.

5.1.5. Avgassing/evakuering av luft

Avgassing av løsninger ble gjort ved hjelp av vakuum fra vannstråle eller pumpe, eller ved gjennombobling av helium i 15-25 minutter avhengig av volum.

5.1.6. Volumreduksjon

Prinsipp

Volumet av løsninger ble redusert og løsninger oppkonsentrert ved å dampe inn løsningen på rotavapor. På denne måten kunne flyktige organiske forbindelser som toluen fjernes.

Utstyr

Rotavapor (Büchi R-200) med vakuumpumpe og kjøleoppsats

Pærekolbe

Prosedyre

Løsningene ble inndampet på rotavapor ved 40-55 °C under vakuum.

5.1.7. Vask av dialyseslanger

Prinsipp

Dialyseslanger ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle celluloserester

Reagenser

2 % NaOH-løsning

0,05 % natriumazidløsning (NaN_3)

Utstyr

Dialyseslanger Spectra/Por[®]3, MWCO 3.500 Da, d: 29 mm

Hansker og briller

Kokeplate

Begerglass

Prosedyre

1. Dialyseslangen ble klippet til ønsket lengde (50-60 cm) og skylt godt under springvann
2. Slangen ble så kokt i 10 minutter i 2 % NaOH-løsning.
3. Etter koking ble slangen skylt grundig, inn- og utvendig, først med springvann, deretter med destillert vann
4. Slangen ble så kokt 10 minutter i destillert vann
5. Deretter ble slangen skylt i destillert vann
6. Slangen ble frem til bruk oppbevart i 0,05 % natriumazidløsning ved 4 °C for å hindre bakterievekst.

5.1.8. Dialyse**Prinsipp**

Dialyse gjennomføres for å rense løsninger for salter og andre lavmolekylære forbindelser. Stoffer med molekylvekt lavere enn dialyseslangens cut off-verdi (MWCO), vil diffundere ut gjennom slangens porer så lenge det er konsentrasjonsforskjell. Det er derfor viktig å jevnlig skifte væske på utsiden av slangen for å opprettholde den osmotiske gradienten.

Reagenser og utstyr

Toluen (Prolabo)

AgNO₃-løsning (mettet)

Dialyseklemmer

Magnet og magnetrører

Dialyseslanger: Spectra/Por[®]3, MWCO 3.500 Da, d: 29 mm

Begerglass

Prosedyre

1. Dialyseslangen ble lukket i en ende med klemme og fylt med litt destillert vann for å kontrollere at den var tett
2. Slangen ble holdt over et stort begerglass og fylt 2/3 fulle med prøveløsning
3. 1-2 dråper toluen ble tilsatt for konservering
4. Luft ble så fjernet fra slangen som ble lukket i den åpne enden

5. Slangen ble lagt i en bøtte under rennende springvann og dialysert over natten
6. Slangen ble så overført til et stort begerglass med destillert vann og dialysert i ett døgn under stadig omrøring med magnet. Glasstaver forhindret magneten å komme i direkte kontakt med slangen
7. Når 2 ml vann fra begerglasset ikke lenger ble blakket av en dråpe AgNO_3 -løsning ble dialysen avsluttet

5.1.9. Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet ved hjelp av:

- Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)
- Whirlimixer (Fisons)
- MS2 Minishaker (IKA©)

5.1.10. Frysetørring

Prinsipp

Prøver ble tørket ved at vann ble fjernet fra frossen prøve ved sublimering vha. vakuum.

Utstyr

Frysetørker:

- Christ[®] Alpha I-4
- Christ[®] Alpha I-6
- Heto DRYWINNER DW 1,0-60E

Hetofrig metanolbad (Heto Birkerød, Danmark)

Prosedyre

1. Prøveløsning ble redusert til ønsket mengde vha. rotavapor.
2. Prøveløsning ble nedfrosset på metanolbad ved - 40 °C eller i fryser.
3. Rundkolber med glassull i åpningen ble festet utenpå frysetørker og prøver andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og satt inn i frysetørker.
4. Prøvene ble tatt av frysetørker når kolben hadde nådd romtemperatur. Dette tok normalt 24-48 timer.

5.1.11.Syrevask av glassutstyr

Prinsipp

Glassutstyr som har vært lagret i papp- og papiremballasje kan inneholde forurensinger fra cellulose. For å fjerne disse og andre potensielle karbohydratforurensinger før karbohydratanalyser vaskes utstyret i konsentrert saltsyre. Dette spalter polysakkaridene og de fjernes ved grundig skylling i etterkant.

Reagenser

Konsentrert HCl (Prolabo)

Springvann og destillert vann

Utstyr

Varmeskap

Hansker og briller

Prosedyre

1. Glassutstyret ble fylt/dekket av saltsyre. Henstand 30 minutter.
2. Utstyret ble grundig skylt og tørket i varmeskap ved 80 °C

5.1.12. pH-måling

pH-strips: Neutralit[®] pH 1-14 (Merck)

5.1.13.Absorbansmåling

BIO-RAD MODEL 3550 mikroplateleser

Thermomax mikroplateleser

Pharmacia Biotech Novaspec II

5.2. Isolering av polysakkarider

5.2.1. Preparering av tørket plantemateriale

Blader ble kjøpt på Medina-markedet i Bamako, Mali november 2005.

Prosedyre

1. Bladene ble lagt ut til tørk i romtemperatur i 3 døgn
2. Bladene ble tatt av grenene og pulverisert vha. mekanisk kuttemaskin.

5.2.2. Diklormetaneekstraksjon

Prinsipp

For å fjerne lavmolekylære og upolare organiske forbindelser som kan interferere med polysakkaridanalyser ble plantematerialet ekstrahert med diklormetan (DCM).

Reagenser

Diklormetan (Merck)

Utstyr

Varmemantel

Rundkolbe

Soxhletkolonne tilkoblet kjøler

Soxhletfilter

Prosedyre

1. 201,6 g plantemateriale ble lagt i filteret
2. Rundkolben ble fylt med ca 4 L DCM
3. Prøvematerialet ble ekstrahert til ekstraktet var nesten fargeløst

5.2.3. Metanolekstraksjon

Prinsipp

For å fjerne lavmolekylære og upolare organiske forbindelser som kan interferere med polysakkaridanalyser ble plantematerialet ekstrahert med metanol (MeOH). MeOH-ekstraksjonen ble gjort for å få med stoffer som ikke løste seg i DCM.

Reagenser

Metanol 96 % (Merck)

Utstyr

Varmemantel

Rundkolbe

Soxhletkolonne tilkoblet kjøler

Soxhletfilter

Prosedyre

1. Oppsatsen med plantemateriale fra metode 5.2.2 ble brukt
2. Rundkolben ble fylt med ca 4 L MeOH
3. Prøvematerialet ble ekstrahert til ekstraktet var nesten fargeløst
4. Plantematerialet ble tatt ut av filteret og lagt til tørking på aluminiumsfolie i romtemperatur

5.2.4. Vannekstraksjon

Prinsipp

Polare forbindelser som polysakkarider løses godt i vann. Varierende grad av løselighet av polysakkaridene medfører at de løser seg ved forskjellige temperaturer. Ved å ekstrahere materialet ved to forskjellige temperaturer oppnår man dermed to fraksjoner med forskjellig sammensetning av polysakkarider.

Reagenser

Vann

Utstyr

Varmemantel (Barnstead Electrothermal)

Rundkolbe med kjøler

Termometer

Magnetrører (KMO2 Basic IKA®)

Gasbind

Utstyr til filtrering gjennom glassfiberfilter med nutsj og vannstrålevakuum

Prosedyre

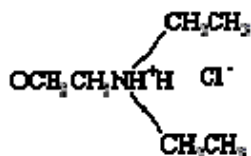
1. Tørket plantemateriale fra metode 5.2.3, 162,6 g, ble overført til begerglass med magnet og ca 1,6 L vann ble tilsatt (ca 10 ml/g)
2. Plantematerialet ble ekstrahert ved 50 °C i ca 2 timer
3. Blandingen ble filtrert gjennom gasbind og deretter glassfiberfilter med sug
4. Punkt 1.-3. ble gjentatt
5. Ekstraktene ble slått sammen, redusert på rotavapor (metode 5.1.6) og dialysert (metode 5.1.8)
6. Plantematerialet ble overført til en glasskolbe i varmemantel og ca 1,6 L vann ble tilsatt
7. Plantematerialet ble ekstrahert ved koking på reflux i ca 2 timer
8. Blandingen ble filtrert gjennom gasbind og deretter glassfiberfilter med sug
9. Punkt 6.-8. ble gjentatt
10. Ekstraktene ble slått sammen, redusert på rotavapor (metode 5.1.6) og dialysert (metode 5.1.8)

5.2.5. Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow

(Greibrokk 1998b, Pharmacia-Biotech)

Prinsipp

Ionebytterkromatografi separerer stoffer i prøveløsningen ved at deres ioniske eller ioniserbare grupper har forskjellig elektrostatiske tiltrekning til stasjonærfasens ioniske funksjon. Ladde grupper adsorberes reversibelt til stasjonærfasens kovalent bundne ioniske eller ioniserbare grupper av motsatt ladning. De adsorberte stoffene elueres ut vha. mobilfaser med ulike ionestyrke og separeres dermed i henhold til ladning. Polysakkarider bygget opp av forskjellige monosakkarider vil ha forskjellig grad av negativ ladning og antall ladde grupper.



Figur 5.1 DEAE med motion

DEAE Sepharose[®] Fast Flow er en svak anionbytter med diethylaminoetyl (DEAE) som kation (Figur 5.1). De negativt ladde, eller sure, polysakkaridene binder seg med ulik styrke til kationet og kan elueres ut, separert etter økende surhetsgrad, med økende ionestyrke på gradienten. Nøytrale polysakkarider vil ikke interagere med kolonnematerialet og kan elueres ut med vann før de sure molekylene elueres med NaCl-gradient.

Reagenser

Vann

2 M NaCl (Merck)

1 M natriumacetat, justert til pH 3 med konsentrert HCl

0,5 M NaOH

0,05 % NaN₃

Mettet AgNO₃-løsning

Alle løsninger som skulle appliseres på kolonne ble degasset (metode 5.1.5) og filtrert 0,22 µm.

Utstyr

Kolonne: Pharmacia

Matriks: DEAE Sepharose[®] Fast Flow i 20 % etanol (Amersham Pharmacia Biotech AB)

Kolonnevolum: 250 ml

Porestørrelse: 45-165 µm

Pumpe: Perimax Spetec (Holger teknologi)

Fraksjonssamler: LKB SuperFrac (Pharmacia)

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, plast, 15 ml (Heger AS)
Trombotes-rør, 7 ml (Heger AS)

Glasstav

Nutsj og vakuumsugoppsats

Prosedyre**A: Pakking av kolonne**

1. Romtemperert kolonnemateriale ble oppslemmet og luft ble fjernet vha. vannstrålevakuum.
2. Kolonnematerialet ble overført til kolonne vha. en glasstav for å hindre dannelse av luftlommer i matriks
3. Vann ble pumpet gjennom kolonne for å pakke kolonnematerialet og fjerne etanol

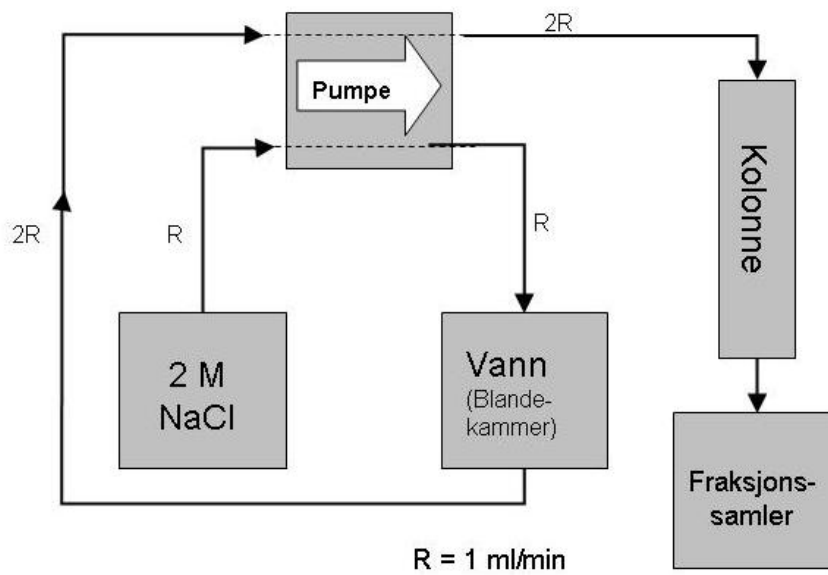
B: Vask og regenerering av kolonne

Tidligere brukt kolonnemateriale ble vasket før påsetting av ny prøve. I tillegg ble kolonnemateriale vasket og satt i 0,05 % NaN_3 ved 4 °C lagring. Etter evt. å ha snudd kolonna 180° ble den vasket med følgende løsninger (minst 1 ½ kolonnevolum av hver):

1. 0,5 M NaOH
2. 2 M NaCl
3. Vann

C: Applisering og eluering

1. Ekstrakter ble filtrert gjennom 5 µm og 0,45 µm filter og applisert på kolonne med en hastighet på 1 ml/min.
2. Nøytrale polysakkarider ble eluert med ca 2 kolonnevolum vann og samlet i en fraksjon. Hastighet 1 ml/min.
3. Sure polysakkarider ble så eluert med NaCl-gradient (Figur 5.2) fra vann til ca 1,5 M NaCl over ca 8 timer. 10 ml fraksjoner ble samlet opp og testet ved hjelp av fenolsvovelsyretest (metode 5.3.5) for å slå fast karbohydratelueringprofilen.
4. Kolonne ble til slutt eluert med 2 M NaCl til fenolsvovelsyretest (metode 5.3.5) ikke lenger viste tegn til karbohydratinnhold.
5. Fraksjonsvolum ble redusert noe (metode 5.1.6) før fraksjonene ble dialysert (metode 5.1.8) og deretter frysetørket (metode 5.1.10).



Figur 5.2 - Oppsett for generering av NaCl-gradient

5.2.6. Gelfiltrering

(Greibrokk 1998a)

I gelfiltrering separeres molekyler basert på molekylstørrelse. Stasjonærfasen er en gelmatriks med definert porestørrelse. Mobilfasen fører prøven gjennom kolonna og molekyler vil, avhengig av størrelse, i ulik grad diffundere inn i porene og dermed få økt retensjonstid. Små molekyler vil i stor grad interagere med stasjonærfasen, men større molekyler heftes i mindre grad og elueres dermed raskere ut.

5.2.6.1. Bio-Gel[®] P-6 DG

(Bio-RadLaboratories)

Prinsipp

Bio-Gel[®] P-6 DG er en meget hydrofil og porøs polyakrylamidgel nesten fri for ladning og er derfor velegnet til å separere ladede molekyler mht størrelse. Gelen har et fraksjoneringsområde på 1000-6000 Da, noe som gjør den velegnet til å separere de store polysakkaridene fra salter og andre mindre molekyler i ekstraktene.

Reagenser

Degasset vann

20 mM NaCl

Utstyr

Kolonne:	Pharmacia L: 100 cm D: 5 cm
Matriks:	Bio-Gel [®] P-6 DG
Partikkelstørresle:	90-180 µm
Utnyttet kolonnevolum:	ca 950 ml
Pumpe:	Pump P-1 (Pharmacia Biotech)
Fraksjonssamler:	RediFrac (Pharmacia Biotech)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS) Glassrør, 20 ml
Filter:	Rundfilter Glasfaser (Sclacher og Schüll) Acro [®] 50A Device with 0,45 µm HT Tuffryn [®] Membrane (PALL)
Plastsprøyte (BD)	
Erlendmeyerkolbe til vakuumfiltrering	

Prosedyre:

A: Preparering av gel og pakking av kolonne

1. Tørr Bio-Gel[®] P-6 DG ble gradvis tilsatt 20 mM NaCl og satt til henstand for hydrering i 4 timer ved romtemperatur
2. Halvparten av supernatanten ble dekantert av og gelen ble degasset ved vannsug
3. To gelvolum degasset buffer ble tilsatt og flasken rotet forsiktig. Når 90-95 % av partiklene hadde lagt seg ble supernatanten dekantert av.
4. Punkt 3 ble gjentatt to ganger
5. Kolonnematerialet ble overført til kolonne vha. en glasstav for å hindre dannelse av luftlommer i matriks
6. Vann ble pumpet gjennom kolonne for å pakke kolonnematerialet

B: Vasking og regenerering av kolonne

Tidligere brukt kolonnemateriale ble vasket før påsetting av ny prøve. I tillegg ble kolonnemateriale vasket og satt i 0,05 % NaN₃ ved 4 °C lagring. Etter evt. å ha snudd kolonna 180° ble den vasket med følgende løsninger (minst 1 ½ kolonnevolum av hver):

1. 1 M NaCl
2. 20 % etanol
3. Vann

C: Applisering og eluering

1. Ekstrakter ble filtrert 0,45 µm filter og applisert på kolonne med en hastighet på 2 ml/min.
2. Det ble samlet fraksjoner på ca 10 eller ca 20 ml (hhv 5 og 10 minutter per rør)
3. Karbohydratelueringprofil ble bestemt vha av fenolsvovelsyretest (metode 5.3.5)

5.2.6.2. Sephacryl S-400

(AmershamBiosciences 2003)

Prinsipp

Sephacryl S-400 er en gelmatriks med stor mekanisk styrke grunnet kovalent kryssbundet alkyldekstran med N,N'-metylenbisakrylaid. Sephacryl S-400 har et fraksjoneringsområde mellom 10 000 og 1 500 000 Da for dekstraner, noe som gjør den velegnet til separasjon av polysakkarider.

Utstyr

Kolonne:	XK 26 (Amersham Biosciences)
Matriks:	Sephacryl S-400 High Resolution
Kolonnevolum:	ca 500 ml
Pumpe:	PERISTALTIC PUMP P-3 (Pharmacia)
Filter:	Acro [®] 50A Device with 5 µm Versapore [®] Membrane (PALL Gelman Laboratory)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 7 ml (Heger AS)

Sprøyte: 10 ml (Terumo)

Prosedyre

1. 10 ml prøveløsning ble filtrert 5 μm og applisert på kolonne ved ca 0,4 ml/min
2. Prøven ble eluert med degasset vann ved ca 0,4 ml/min og det ble samlet opp fraksjoner på ca 3 ml
3. Karbohydratelueringprofil ble bestemt vha fenolsvovelsyretest (metode 5.3.5). Eluatene ble slått sammen til 2 eller 3 fraksjoner
4. Fraksjonene ble frysetørket (metode 5.1.10) for videre analyse

5.2.6.3. PD-10

(AmershamPharmaciaBiotech)

Prinsipp

PD-10 er ferdigpakkede kolonner med Sephadex™ G-25 medium med fraksjoneringsområde 1000-5000 Da og benyttes til avsalting av prøver.

Utstyr

Kolonne: PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech)
H: 5 cm D: 1,5 cm

Matriks: Sephadex™ G-25

Filter: Acro® 50A Device with 0,45 μm HT Tuffryn® Membrane
(PALL Gelman Laboratories)

Oppsamlingsrør: Glassrør, ca 5 ml

Plastsprøyte 10 ml (Terumo)

Prosedyre

5. Kolonne ble ekvilibrert med 25 ml vann
6. 1 ml prøveløsning ble filtrert 0,45 μm og applisert på kolonna
7. Prøve ble eluert med 16 ml vann og fraksjoner på ca 0,5 ml ble samlet opp
8. Hvert rør ble testet for karbohydratinnhold vha fenolsvovelsyretest (metode 5.3.5).
Det ble tatt vare på en fraksjon per prøve
9. Prøvene ble frysetørket (metode 5.1.10) for videre analyse

5.3. Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinnhold

5.3.1. Metanolyse

(Chambers og Clamp 1971)

Prinsipp

Glykosidbindingene mellom polysakkaridenes monomerer brytes i surt, vannfritt metanolmiljø. Dette medfører at det dannes metylglykosider av de enkelte monosakkaridene ved at OH-gruppene ved C-1 metyleres. COOH-gruppene i C-6-posisjon på uronsyrene forestres med metylgrupper. Det vannfrie miljøet forhindrer hydrolyse.

Reagenser

4 M HCl i MeOH

1 µg/µl mannitol i 1 M HCl i MeOH (intern standard)

Vannfri MeOH (Merck)

Utstyr

Alt glassutstyr syrevasket (metode 5.1.11)

Supelco-rør (4 ml) med teflonbelagt (PTFE/liner) skrukork (Supelco)

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

2 ml glasspipette med peleusballong

P₂O₅-evakuert vakuumsiktor

Reacti-Therm™ III Heating Module (Varmeenhet for tørking under N₂-gass) (Pierce)

Heliumgassbeholder

Prosedyre

1. 1 mg prøvemateriale ble innveid i syrevasket Supelco-rør
2. Røret ble dekket med perforert parafilm og tørket i evakuert P₂O₅-eksikator i minimum 24 timer ved romtemperatur.

3. 1 ml 4 M HCl i MeOH og 100 µl intern standard (ca 10 % av avveid prøvemateriale, evt. 25 % av totalt sukkerinnhold) ble tilsatt prøven.
4. Kork ble skrudd på Supelco-røret og satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter ca 15 minutter ble korken skrudd til igjen for å forhindre metanolfordamping.
5. Prøven ble dampet til tørrhet under N₂-gass.
6. 200 µl vannfri MeOH ble tilsatt prøven som igjen ble dampet til tørrhet under N₂-gass.
7. Trinn 6 ble gjentatt 2 ganger
8. Prøven ble tørket i P₂O₅-eksikator i minimum 1 time før den ble TMS-derivatisert som beskrevet i metode 5.3.2.

5.3.2. TMS-derivatisering

(Sweeley, *et al.* 1963)

Prinsipp

For at monosakkarider skal kunne analyseres ved hjelp av gasskromatografi, må det lages derivater som er flyktige og termisk stabile. Dette gjøres ved at man lar de frie, polare hydroksylgruppene i molekylene reagere med heksametyldisilazan og trimetylklorasilan og danne pertrimetylsilyleter, dvs. TMS-derivater.

Reagenser

TMS-reagens: Trimetylklorasilan (TCMS) (Supelco)	1 ml
Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich)	2 ml
Pyridin, vannfri (Merck)	5 ml

Utstyr

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)
SMI Capillaries (blå)

Prosedyre

1. Den metanolyserte prøven fra metode 5.3.1 ble tilsatt 200 µl TMS-reagens og blandet godt

2. Prøven stod minst 30 minutter i romtemperatur før gasskromatografisk analyse (metode 5.3.3)

5.3.3. Gasskromatografi

(Rasmussen 1998)

Prinsipp

Gasskromatografi (GC) separerer stoffer på bakgrunn av kokepunkt og interaksjoner med stasjonærfase. Mobilfase i GC kalles bæregass og er en inert gass, både med hensyn på prøve og stasjonærfase. Stasjonærfase er oftest en ikke-flyktig væske i en tynn film på kolonnen med svært liten interaksjon med prøveløsningen. Applisert prøve fordampes i injektor og fraktes med bæregassen gjennom kolonne til detektor. Retensjonstid for prøven er sterkt temperaturavhengig og det er derfor hensiktsmessig å ha faste temperaturregulerte programmer for å oppnå reproducerbar separasjon. Prøvene detekteres av en flammeioniseringsdetektor bestående av en ren flamme av hydrogen og oksygen. Når organisk materiale fra prøven forbrennes i flammen, dannes ioner som detekteres som elektrisk strøm. Mengden ioner som produseres, og dermed også signalstyrken, er proporsjonal med mengden stoff som forbrennes.

Monosakkarider finnes på pyranose- eller furanoseform og hver av disse kan igjen ha α - eller β -konfigurasjon. Monosakkarider finnes både i åpen og i ringstruktur og det innstiller seg en likevekt mellom formene. Forskjellige konfigurasjoner interagerer forskjellig med stasjonærfaser og i kromatogrammet vil det dermed dannes et karakteristisk mønster som benyttes til identifikasjon av monosakkarider. Kvantitative bestemmelser kan også gjøre ved hjelp av toppareal fra kromatogrammet, forhåndskjorte standardkurver og internstandarder som korrigerer for tap under prøveopparbeidelse.

Utstyr

Gasskromatograf:	GC 6000 VEGA SERIES 2 (CARLO ERBA INSTRUMENTS)
	Programmeringsenhet: ICU 600
Integrator:	C-R6A CHROMATOPAC (Shimadzu)
Detektor:	FID

Injektor:	Splitt:splittless		
Kolonne:	DB5 (J&W Scientific) ”Fused Silica” kapillærkolonne		
	Lengde:	25 m	Indre diameter: 0,32 mm
	Filmtykkelse:	0,25 µm	
Bæregass:	Helium		
Flow:	Kolonne:	1,8 ml/min	
	Splitt flow:	~ 11 ml/min	
	Splittforhold:	1:6	
Injeksjonsvolum:	0,5-1,0 µl		
Injektortemperatur:	260 °C		
Detektortemperatur:	310 °C		
Temperaturprogram:	140 °C $\xrightarrow{1\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$ 250 °C		

5.3.4. FPLC – Superose 6

Prinsipp

Molekylvektsdistribusjon i polysakkaridprøver ble bestemt ved hjelp av FPLC og kjente dekstranstandarder. Det ble laget en standardkurve der logaritmen av molekylvekt ble plottet mot elueringsvolum. FPLC er en metode basert på gelfiltreringsprinsippet beskrevet i 5.2.6. Den ble opprinnelig utviklet for proteinseparasjon, men egner seg også godt for arbeid med polysakkarider. Superose 6 er en matriks bestående av kryssbundet agarose med optimalt separasjonsområde for globulære proteiner fra 5-5 000 kDa. Det ble benyttet UV-deteksjon ved 214 nm.

Reagenser

Mobilfase: 10 mM NaCl, degasset og filtrert 0,22 µm
 0,1 M NaOH
 50 % eddiksyre (Prolabo)

Utstyr

AKTA-FPLC (Amersham Pharmacia Biotech)

Kolonne: Tricorn Superose 6 10/300 GL (ferdigpakket)
 Volum: 24 ml

Pumpe: P-920
 Injektor: Valve Inv-907
 Monitor: UPC 900
 Fraksjonssamler: Frac 900 (Amersham Pharmacia Biotech)
 Skriver: HP DeskJet 980
 Dataprogram: Unicorn v4.00.16
 1 ml sprøyte (Terumo)
 Oppsamlingsrør: 7 ml (Heger AS)
 Millex[®] HA Syringe driven Filter Unit, 0,45 µm, non-sterile

Systembetingelser

Konsentrasjon prøveløsninger: 2 mg/ml
 Injeksjonsvolum: 500 µl
 Elueringshastighet: 0,5 ml/min

Standarder

4 dekstraner med kjent molekylvektsdistribusjon ble benyttet som standarder for å kunne lage en standardkurve som ble brukt til estimering av molekylvektsdistribusjon i prøvene. Oversikt over dekstranstandarder benyttet i forsøket vises i Tabell 5.1.

Tabell 5.1 Oversikt over molekylvekt av dekstranstandarder brukt i forsøket.

	Mw (Da)	Mn (Da)
T500, lot 9307	475 000	153 000
T250, lot 8374	233 000	123 000
B512 (Dex 40T Fr 7, 8030)	19 000	18 500
B512 (Fr 11640-II-IX)	5 600	3 170

Prosedyre

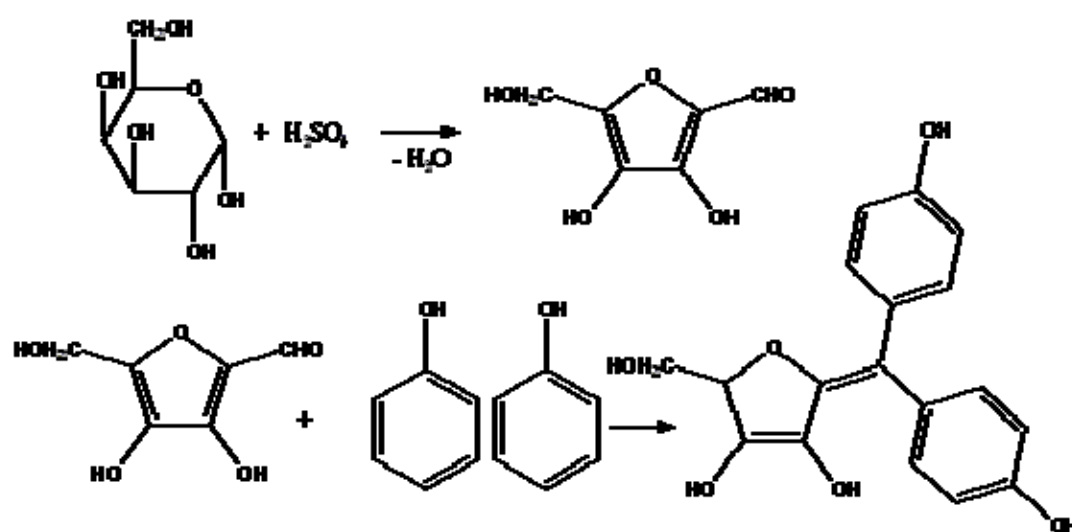
1. 2 mg prøve eller dekstran ble løst i 2 ml 10 mM NaCl og filtrert 0,45 µm
2. 500 µl ble injisert i FPLC og eluert ved 0,5 ml/min
3. 71 fraksjoner à 0,5 ml ble samlet og karbohydratinnhold ble bestemt ved hjelp av FSS (metode 5.3.5)

5.3.5. Fenolsvovelsyretest

(Sturgeon 1990)

Prinsipp

Fenolsvovelsyretest (FSS) benyttes til å bestemme karbohydratinnhold i en løsning. På denne måten kan elueringsprofil for karbohydrater vises. Konsentrert svovelsyre spalter polysakkarider og monosakkaridene danner et gulfarget kompleks (Figur 5.3) i reaksjon med fenol. Dette komplekset kan detekteres spektrofotometrisk ved 490 nm.



Figur 5.3 Reaksjon mellom et monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker som kondenserer med fenolmolekyler og danner et farget kompleks.

Reagenser

Fenol 4 % (Merck)

Konsentrert svovelsyre (Merck)

Utstyr

Finnpipette 40-200 μl (Labsystems)

Glassrør, 6 ml

Whirlimixer (Fisons)

Mikroplater med flat bunn

BIO-RAD MODEL 3550 MICROPLATEREADER

Verneutstyr

Prosedyre

1. 100-200 µl av løsning som skulle testes ble overført til glassrør og tilsatt 200 µl og tilsatt 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre. Det samme ble gjort med 100-200 µl destillert vann som referanseprøve
2. Blandingen ble mikset godt og satt til henstand i romtemperatur i 30 minutter
3. Absorbans ble målt ved 490 nm.

5.4.Strukturopklaring

5.4.1. Enzymatisk degradering

(Samuelsen, *et al.* 1996, Voragen, *et al.* 2000)

Prinsipp

For å skille de forgrenede områdene fra resten av pektinet benyttes enzymer med kjent aktivitet. Uronsyrene i prøvene deesterifiseres med NaOH for bedre effekt av enzymet. Endo-polygalakturonidase spalter deretter glykosidbindinger i områder med ikke-esterifisert homogalakturonan. De forgrenede områdene kan deretter skilles fra de avspaltede molekylene av lavere vekt ved gelfiltrering på PD-10-kolonne for videre undersøkelser.

Reagenser

0,1 M NaOH

Eddiksyre p.a. (Prolabo)

Toluen (Prolabo)

50 mM natriumacetatbuffer (pH = 4,0)

Endo-POLYGALACTURONANASE 5000 U; 800 U/mg; 5000 U/ml in 3.2 M ammonium sulphate (Megazyme)

Utstyr

Små erlendmeyerkolber

Magnet og magnetrører

Ultralydbad

pH-papir

Millex[®] AA Syringe Driven Filter Unit 0,8 µm (Millipore)

Sentrifuge: HERMLE Z382K

NOVASPEC[™] (LKB BIOCHROM)

Whirlimixer (Fisons)

Prosedyre

1. 3-4 mg frysetørket prøvemateriale ble løst i 4 ml NaOH i en liten erlendmeyerkolbe. Prøven ble sonikert på ultralydbad til prøven var løst
2. Prøven ble satt til henstand 2 timer ved romtemperatur
3. Prøven ble tilsatt eddiksyre for nøytralisering. pH ble målt ved hjelp av pH-papir
4. 30 ml natriumacetatbuffer og noen dråper toluen ble tilsatt løsningen
5. 60 µl endo-polygalakturonanase ble tilsatt og kolben ble satt på omrøring i 3 døgn ved 30 °C
6. Løsningen ble brakt til koking for denaturering av enzym
7. Etter avkjøling og sentrifugering ble supernatanten filtrert (0,8 µm) og applisert på PD-10-kolonne (metode 5.2.6.3). Karbohydratelueringsprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.5)
8. Prøven ble deretter frysetørket og undersøkt for biologisk aktivitet ved metode 5.5.1 og karbohydratsammensetning og struktur ble undersøkt ved henholdsvis metode 5.3.1-5.3.3 og 5.4.2

5.4.2. Metylering

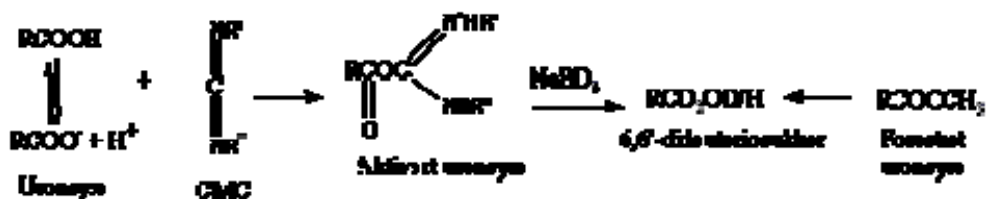
5.4.2.1. Karboksylsyre-reduksjon

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Før metylering (metode 5.4.2.2) må esterifiserte polysakkarider og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyreenheter reduseres. Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer vha NaBD₄, mens frie uronsyrer aktiveres med

carbodiimid før reduksjon. Det dannes 6,6-dideuteriosukkere som skilles fra nøytrale sukkerer ved GC-MS-analyser pga annen fragmentmasse ($M^+ + 2$) (Figur 5.4).



Figur 5.4 Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon av foretrest uronsyre.

Reagenser

500 mM imidazol-HCl

100 mg/ml NaBD₄ (Aldrich) i imidazol-HCl (nylaget)

Iseddik p.a. (Prolabo)

0,2 M MES (2-[N-morfolino]etansulfonsyre), pH 4,75 (Sigma)

2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9 (Sigma)

500 mg/ml carbodiimid (1-cykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)-carbodiimid-meto-p-toluensulfonat) (nylaget)

Oktanol (Merck)

Utstyr

Metyleringsrør (syrevasket)

Is

pH-papir

Dialyseslanger – Spectra/Por[®]3, MWCO: 3.500, d:29 mm

MS2 Minishake IKA[®]

Finn[®]-pipetter med spisser (Thermo Labsystems)

Prosedyre

1. 2 mg prøve ble løst i 5 ml iskald 500 nM imidazol-HCl
2. Karboksylsyre ble redusert ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD₄ i imidazol-HCl (300 µl + 300 µl + 400 µl). Prøvene ble mikset og satt på is i 5 minutter etter de første to tilsetningene og 30 minutter etter siste tilsetning

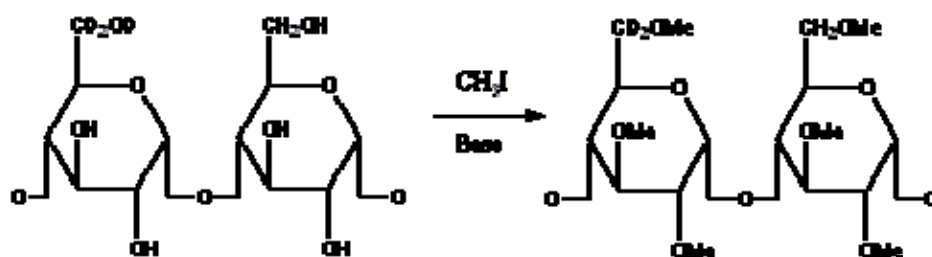
3. Overskudd av reaktant ble fjernet ved langsom tilsetning av opptil 400 μ l iseddik. Reaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og $\text{pH} < 7$.
4. Prøvene ble dialysert etter metode 5.1.8
5. Prøvene ble deretter frysetrøket (metode 5.1.10)
6. De frysetørkede prøvene ble løst i 1 ml vann og tilsatt 200 μ l MES og 400 μ l nylaget 500 mg/ml carbodiimid i destillert vann. Prøvene ble inkubert i 3 timer ved ca 25 °C.
7. Prøvene ble tilsatt 1 ml 2 M TRIZMA og 4 dråper oktanol som antiskummiddel. Prøvene ble avkjølt på is
8. Prøvene ble tilsatt 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD_4 i 0,05 M NaOH og inkubert over natt ved 4 °C
9. Prøvene ble dialysert (metode 5.1.8) og frysetørket (metode 5.1.10)

5.4.2.2. Metylering

(Ciucanu og Kerek 1984)

Prinsipp

Frie hydroksylgrupper i polysakkarider metyleres vha metyljodid etter deprotonering i sterkt basisk miljø (Figur 5.5)



Figur 5.5 Metylering av hydroksylsyregrupper.

Reagenser

Vannfri metanol (Merck)

Dimetylsulfoksid (DMSO) (Merck)

NaOH-pellets, tørr (Merck)

Metyljodid (Merck)

100 mg/ml natriumtiosulfat (Merck) i destillert vann

Kloroform (Prolabo)

Utstyr

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

MS2 Minishake IKA®

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med nitrogengass

Ristestativ: Vibrax – VXR (IKA Labortechnik)

Agatmorter

Whirlimixer (Fisons)

Sentrifuge: MSE bordmodell

Ultralydbad

Prosedyre

1. Frysetørket prøve fra metode 5.4.1 ble løst i 200 µl vannfri metanol og tørket under nitrogengass
2. 500 µl DMSO ble tilsatt prøven og ristet i 20 minutter ved ca 200 rpm for å løse sukrene. Dårlig løselige prøver ble sonikert på ultralydbad
3. NaOH ble revet med DMSO i agatmorter til konsentrasjonen var ca 120 mg/ml
4. 500 µl DMSO/NaOH-suspensjon ble tilsatt det løste sukkeret uten å berøre glassveggene
5. Prøven ble ristet i ca 30 minutter ved 200 rpm
6. 100 µl metyljodid ble tilsatt prøven før risting i 10 minutter
7. Punkt 6 ble gjentatt
8. 200 µl metyljodid ble tilsatt og prøven ble ristet ved 200 rpm i 20 minutter
9. Prøven ble tilsatt 2 ml kloroform og 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat i vann før miksing og sentrifugering
10. Øvre fase (vannfasen) ble fjernet

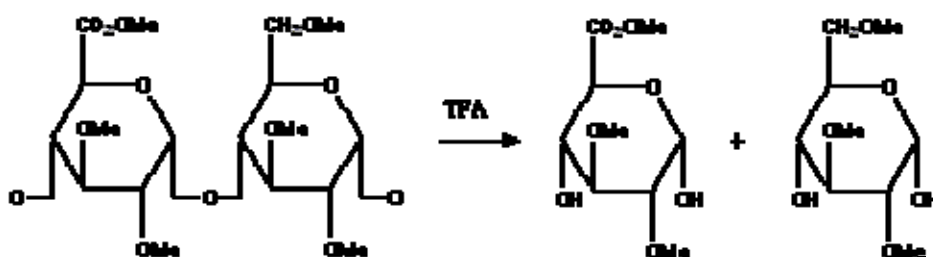
11. Kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml vann. Den ble blandet godt og sentrifugert hver gang før fjerning av vannfase
12. Den gjenværende kloroformfasen ble tørket under nitrogengass

5.4.2.3. Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Metylerte polysakkarider spaltes til monosakkarider ved hydrolyse i surt miljø (Figur 5.6).



Figur 5.6 Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA

Reagenser

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

Utstyr

Varmeenhet til tørking under nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Varmeskap: Function Line, Heraus Instruments

Prosedyre

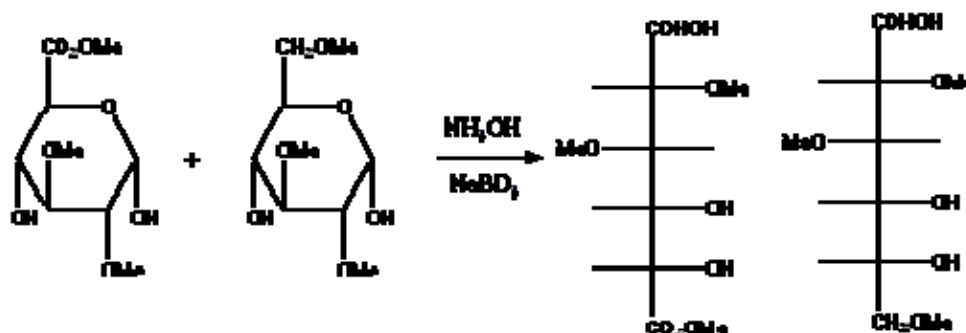
1. Metylert prøve fra metode 5.4.2.2 ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA og flushet med nitrogengass
2. Prøver ble inkubert ved 100 °C i 2 timer, deretter avkjølt og dampet til tørrhet med nitrogengass

5.4.2.4. Reduksjon

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Ringstruktur i monosakkarider brytes ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres til alditol (Figur 5.7).



Figur 5.7 Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1.

Reagenser

2 M NH_3 (Merck)

1 M NaBD_4 , nylaget (Aldrich)

Iseddik (Prolabo)

5 % eddiksyre i metanol

Metanol (Merck)

Utstyr

Ultralydbad

Varmeskap: Function Line, Heraus Instruments

Varmeenhet til tørking med nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Finn[®]-pipetter[®] (Thermo Labsystems) med spisser

Prosedyre

1. Prøve fra metode 5.4.2.3 ble løst i 500 μl 2 M NH_3 og tilsatt 500 μl nylaget 1 M NaBD_4 i 2 M NH_3
2. Prøven ble sonikert før inkubering ved 60 °C i 1 time

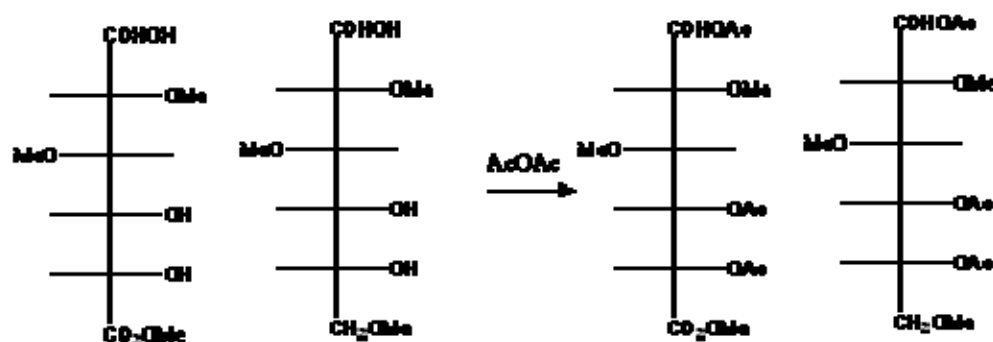
3. Overskudd av reduktant ble ødelagt ved å tilsette 3 x 50 µl iseddik
4. Prøven ble tørket under nitrogengass
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt før tørking under nitrogengass
6. Punkt 5 ble gjentatt
7. 2,5 ml metanol ble tilsatt for å fjerne borsyre. Prøvene ble deretter tørket under nitrogengass
8. Punkt 7 ble gjentatt

5.4.2.5. Acetylering

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Monosakkardine har, etter hydrolyse (metode 5.4.2.3) og reduksjon (metode 5.4.2.4), frie hydroksylgrupper. Disse acetyleres med eddiksyreanhydrid for økt egnethet for gasskromatografisk separasjon (Figur 5.8).



Figur 5.8 Acetylering med eddiksyreanhydrid (AcOAc).

Reagenser

1-metylimidazol (Sigma)
 Eddiksyreanhydrid (Merck)
 Diklormetan (DMC) (Merck)
 Metanol, vannfri (Merck)

Utstyr

MS2 Minishake IKA®
 Ultralydbad

Sentrifuge

Varmeanhet til tørking med nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Finn®-pipetter[®] (Thermo Labsystems) med spisser

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Supelco-rør (4 ml) med teflonbelagt skrukork (PTFE/liner)

Prosedyre

1. 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid ble tilsatt redusert prøve fra metode 5.4.2.4. Prøven ble blandet godt, evt sonikert på ultralydbad og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter
2. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml vann. Prøven ble blandet godt og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter
3. Delvis metylerte sukker ble ekstrahert med 2 x 1 ml DCM. For hver ekstraksjon ble prøven blandet godt, sentrifugert og DCM-fasen samlet opp
4. Ekstraktene ble samlet opp og tilbakevasket med 2 x 5 ml vann
5. Diklormetan ble overført til et Supelco-rør og tørket under nitrogengass
6. Prøven ble løst i 50 µl vannfri metanol og analysert ved GC-MS

5.4.3. Bestemmelse av eddiksyre- og metanolinnhold

(Levigne, *et al.* 2002, Liljebäck 2006)

For pektiner er esterfisering av GalA med metanol og/eller eddiksyre er en viktig strukturell egenskap som har stor betydning for pektiners funksjon i celleveggen. Esterfiserte syregrupper i pektiner endrer egenskapene og kan ofte forklare innhold av GalA i mer eller mindre nøytrale fraksjoner. Denne metoden beregner esterfiseringsgrad ved å bestemme innhold av metanol og eddiksyre. Metyleringsgrad korresponderer med andel karboksylgrupper esterfisert med metanol, mens acetyleringsgrad er definert som andel GalA esterfisert med acetyl under forutsetningen at kun hydroksylgrupper er acetyliert.

Reagenser

10 mM CuSO₄ (Merck) + 25 mM isopropanol (Arcus)

1 M NaOH (Merck)

H₂SO₄ (Merck)

Utstyr

Supelcorør med spiss bunn (5 ml)

Magnetrører med magnet

Sentrifuge: MSE Bordmodell

10 ml plaststprøyte (BD)

1 ml plastsprøyte (BD)

Maxi Clean IC-H-kolonne (Alltech)

HPLC-oppsett:

Pumpe: Shimadzu LC-6A

Kolonne: Supersphere 100RP-18, 250 x 4 mm (encapped C18)

Detektor: Shimadzu, RID-10A

Integrator: 2220 Recording Integrator, LKG, Bromma

Prosedyre

1. 5 mg prøve ble veid inn i et spissbunnet Supelcorør
2. 0,5 ml 10 mM CuSO₄ + 25 mM isopropanol ble tilsatt, blandet og satt på magnetrøring i én time
3. 0,5 ml 1 M NaOH og blandet godt. Blandingen ble satt på magnetrøring ved 4 °C i én time
4. Prøven ble sentrifugert og supernatanten og filtrert gjennom en Maxi-clean-kolonne, forvasket med vann
5. Standardløsning med kjent innhold metanol, eddiksyre og isopropanol ble injisert på HPLC og eluert med 4 mM H₂SO₄ ved 0,7 ml/min
6. Prøve ble injisert i HPLC og eluert med 4 mM H₂SO₄ ved 0,7 ml/min

5.5. Biologisk aktivitet

5.5.1. Komplementfikseringstest

(Michaelson, *et al.* 2000, Wagner, *et al.* 1999)

Prinsipp

Komplementfikseringstesten måler reduksjon av hemolysegrad for sensitiviserte røde blodceller fra sau (SRBC). Humant komplement reagerer med immunkomplekser av SRBC og antigen fra kanin, dermed aktiveres komplementkaskaden via den klassiske aktiveringsveien og fører endelig til lysering erytrocyttene. Polysakkarider fra prøver får anledning til å interagere med det humane komplementet før blodcellene tilsettes. Siden både inhibering og aktivering av komplementsystemet i denne testen vil medføre lavere lyseringsgrad, er det ikke mulig for en enkelt prøve å slå fast hvilken mekanisme som er dominerende. Ved inhibering av komplementsystemet er det mindre komplement tilgjengelig for lysering og ved aktivering forbrukes komplement og mindre er dermed tilgjengelig for lysering.

Reagenser

0,9 % NaCl (Merck)

Vann

Veronal/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) 30 % og 0,02 % natriumazid

Saueblod: Hvit 120 23.02.06
Hvit 122 08.08.06
Hvit 133 12.10.06

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor serum hemolysis
Fortynnet 1:10 veronalbuffer

Komplementkilde: ECG 29.11.05

Standard: *Plantago major* L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml

Utstyr

Sentrifuger: CP centrifuge (Beckmann)
GLC-4, General Laboratory Centrifuge (SORVAL[®])

Varmeskap med ristepate: Termaks, 37 °C

Plastpipette

Mikrotiterplater 96 brønner med rund og flat bunn (NUNC™
MICROWELL PLATE/ NUNC™:NUNCLON™
surface)

Mikroplateleser: Thermomax

Whirlimixer (Fisons)

Finn®-pipetter med spisser

Prosedyre

A: Vasking av saueblodceller

1. 100 µl blod per plate ble tatt ut uten å slemme opp blodet
2. Blod ble vasket to ganger 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA-buffer.
Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet

B: Sensibilisering av saueblodceller

1. 5,295 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt 15 µl Virion 9020 Amboceptor og 60 µl vaskede blodceller
2. Blandingen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
3. Blodet ble vasket to ganger med 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet
4. 5,940 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt

C: Fortynning av prøver

1. Ca 1 mg frysetørket prøve ble løst i veronal/BSA-buffer til en 1 mg/ml-løsning
2. En tofolds fortynningsrekke ble laget (Tabell 5.2)

Tabell 5.2 Fortynningsrekke for prøver og standard

Rør #	Konsentrasjon (µg/ml)		
1	500	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl av stamløsning
2	250	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 1
3	125	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 2
4	62,5	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 3
5	31,3	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 4
6	15,6	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 5
7	7,8	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 6
8	3,9	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 7

D: Titreringskurve for komplementkilde

- 12 brønner i en rundbunnet mikrotiterplate ble tilsatt 100 µl vann og 32 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer
- Komplement ble fortynnet med veronal/BSA-buffer som vist i Tabell 5.2 og 50 µl av blandingene ble tilsatt brønnene (4 paralleller av hver fortynning)

Tabell 5.3 Titreringskurve for komplementkilde

Komplement:buffer	Komplement (µl)	Veronal/BSA-buffer (µl)
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

- Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
- Det ble tilsatt 50 µl 1 % SRBC i alle brønnene og platen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
- Platen ble sentrifugert og 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering
- Absorbans ble avlest ved 405 nm

E: Utføring av test

1. I en rundbunnet mikrotiterplate med 96 brønner ble det tilsatt 100 µl vann i 4 brønner for 100 % lysekontroll og 50 µl veronal/BSA-buffert til kontroll.
2. Komplement ble tatt rett opp av fryseren og fortynningen bestemt fra titeringskurven. 50 µl av den riktige fortynningen ble tilsatt alle brønner, bortsett fra de med vann
3. Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
4. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn og platen ble deretter inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
5. Platene ble sentrifugert før 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering
6. Absorbans ble målt ved 405 nm

F: Beregning

Lyseringsgrad som tar høyde for komplementets egenpåvirkning ble beregnet ut fra formelen:

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{A_{\text{kontroll}}}{A_{\text{vann}}} \times 100 \%$$

Inhiberingsgrad for prøvene ble beregnet ut fra følgende formel:

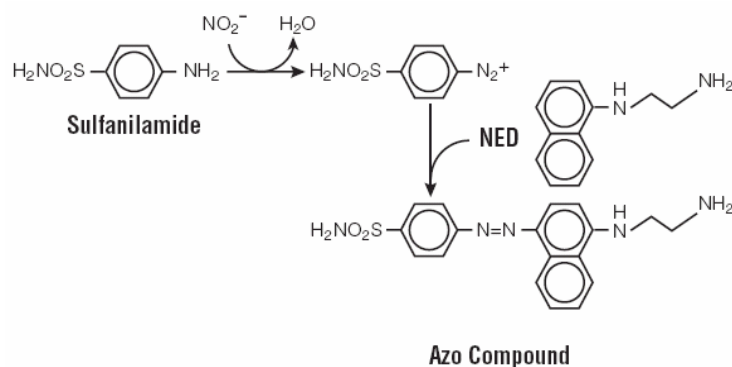
$$\% \text{ inhibering} = \frac{A_{\text{kontroll}} - A_{\text{prøve}}}{A_{\text{kontroll}}} \times 100 \%$$

5.5.2. Måling av NO-frigjøring fra makrofager

(PromegaCorporation 2005)

Prinsipp

Ved aktivering utskiller makrofager nitrogenoksid (NO) og en rekke andre mediatorer som bidrar til immunresponsen. NO brytes ned til to produkter, et av disse er den stabile og ikke-flyktige forbindelsen nitritt (NO_2^-) som har vist seg velegnet som et mål på makrofagaktivitet. Griess-reagenssystemet baserer seg på den kjemiske reaksjoen vist i Figur 5.9, der nitritt reagerer med sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) i surt miljø. Azo-forbindelsen som dannes farger løsningen rosa og konsentrasjon kan avleses ved absorbansmåling. Griess-reagenssystemet er i stand til å detektere nitritt i en mengde forskjellige væskematrikser, inkludert plasma, serum, urin og cellekulturmedium.



Figur 5.9 Kjemiske reaksjoner involvert i NO_2^- -måling i Griess-reagenssystemet (PromegaCorporation 2005)

Reagenser

Dyrkningsmedium:	RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2mM L-glutamin, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoetanol
Griess-reagens A:	1 % Sulfanilamid (Sigma S-9251)
Griess-reagens B:	0,1 % N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) (Sigma N-9125) 2.5 % fosforsyre
Cellelinje:	R2-makrofager derivert fra rottemakrofager

Utstyr

Celleteller:	CoulterCounter
Sentrifuge:	Beckman Rotanta 460R
Flatbunnet mikrotiterplate	
Absorbansmåler:	Titertek Multiskan

Prosedyre

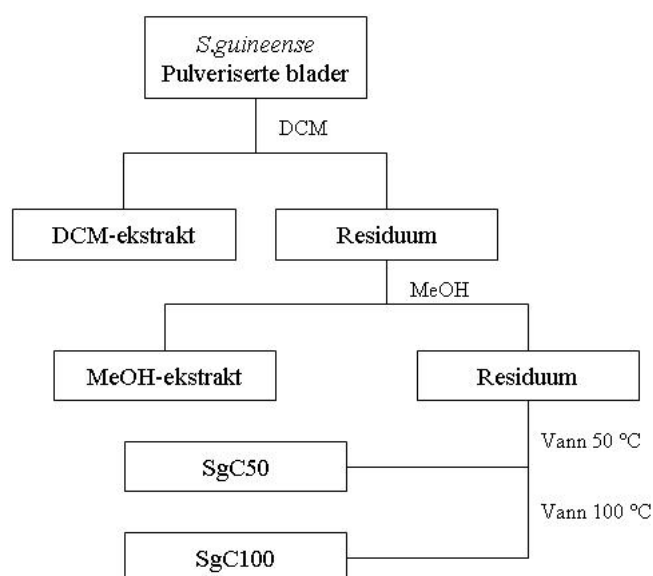
1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. 20 µl cellesuspensjon ble tilsatt 10 ml PBS og cellene talt i en cellteller. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 min
2. Cellene ble resuspendert til 10^6 celler/ml i dyrkningsmedium
3. Celler ble stimulert i flatbunnet mikrotiterplate og tilsatt 50 µl cellesuspensjon (5×10^4 celler) per brønn.
4. 50 µl pektinekstrakt ble tilsatt hver brønn.
5. Fortynningskurve med 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml pektinekstrakt ble laget
6. Celler ble inkubert over natt ved 37 °C
7. 100 µl av supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1300 rpm i 2 min
8. 50 µl av supernatanten ble overført til rundbundet mikrotiterplate
9. Fortynningsrekke av NaNO_3 ble laget med 100 µM, 10 µM, 5 µM, 1,25 µM og 0 µM konsentrasjon
10. 50 µl Griess-reagens A ble tilsatt
11. Prøvene ble satt til henstand 10 minutter ved romtemperatur i mørke
12. 50 µl Griess-reagens B ble tilsatt
13. Absorbans ble målt ved 540 nm

6. Resultater og diskusjon

6.1. Isolering av polysakkarider

6.1.1. Ekstraksjon

Utgangspunktet for ekstraksjon var 201,62 g tørket og pulveriserte blader fra *S.guineense* kjøpt på Medina-markedet i Bamako, Mali november 2005. Materialet ble først ekstrahert med DCM, deretter MeOH og til slutt 50 °C og 100 °C vann. Vanneksraktene ble kalt henholdsvis SgCrude50°C (SgC50) og SgCrude100°C (SgC100). Ekstraksjonsprosessen er illustrert i Figur 6.1. Begge ekstraktene var sterkt brunfarget. SgC50 ble direkte videreført til gelfiltrering, og dermed ikke frysetørket og veid. Utbyttet av SgC100 var 2,15 g som tilsvarer 1,1 % av utgangsmaterialet.

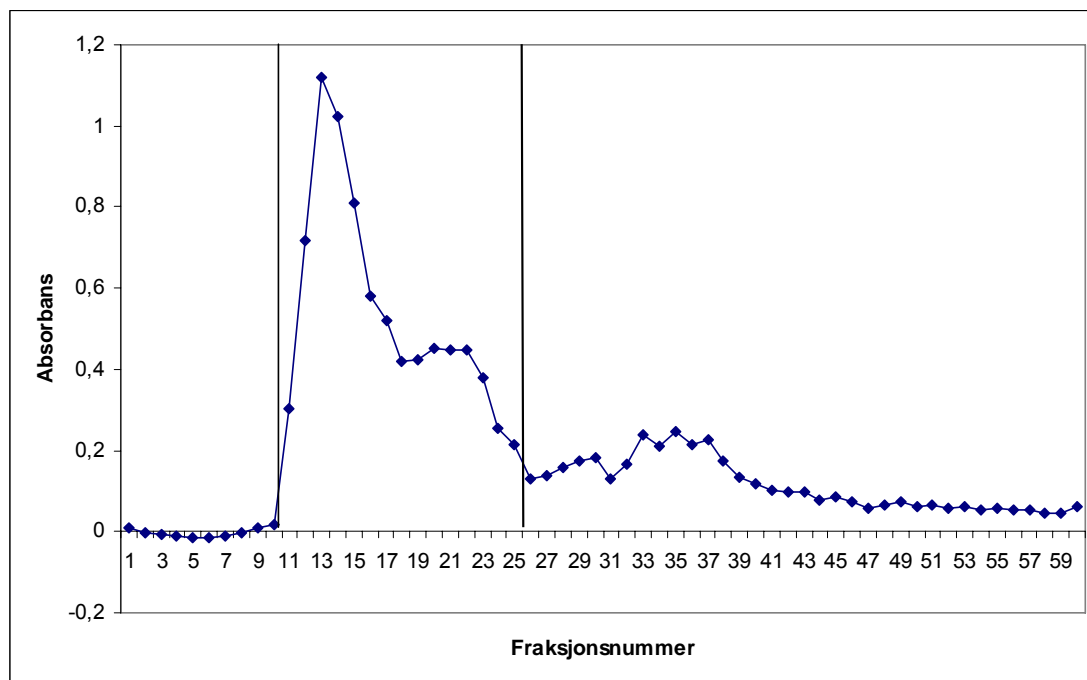


Figur 6.1 Flytdiagram for preparering av vanneksrakt

6.1.2. Gelfiltrering – Bio-Gel® P-6 DG

Siden ekstraktene var svært fargede ble de applisert på Bio-Gel® P-6 DG-kolonne. Ved gelfiltrering separeres stoffer etter molekyllstørrelse noe som medfører at salter og andre lavmolekylære, gjerne fargede forbindelser, kan skilles fra de større polysakkaridene.

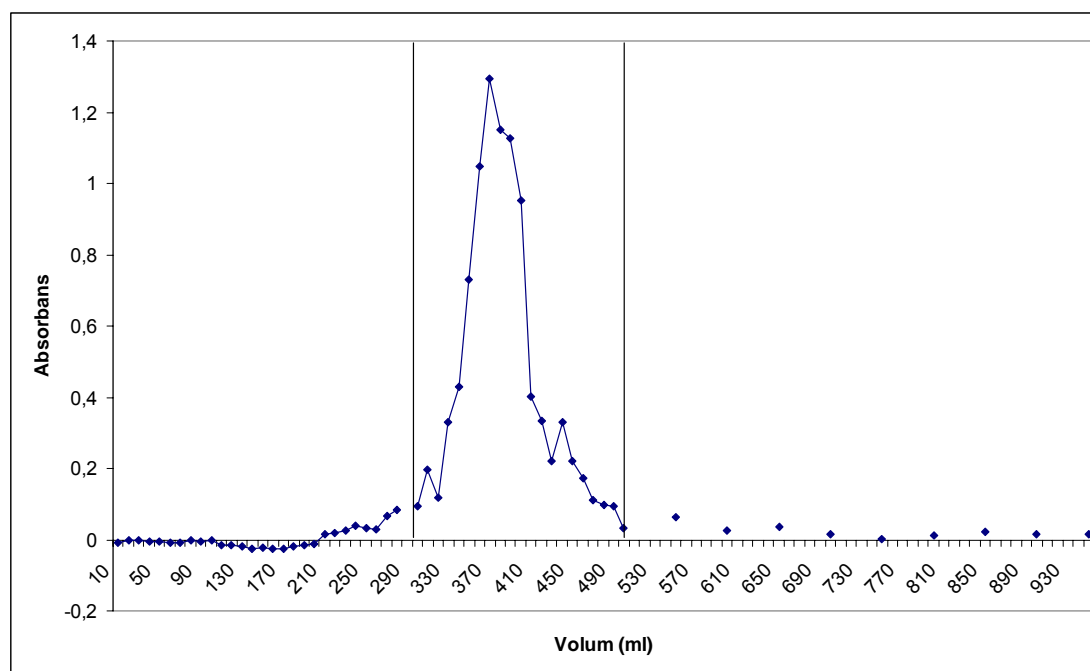
Fraksjoner inneholdende karbohydrater, bestemt ved fenolsvovelsyretest, ble slått sammen til Sg50 og Sg100. Et eksempel på karbohydrat-elueringsprofil for SgC100 vises i Figur 6.2. Begge fraksjonene var svakt gulfarget. Sg50 ble frysetørket og veid til 0,170 g, dette tilsvarer et utbytte på 0,08 % i forhold til utgangsmaterialet. Sg100 ble tatt rett videre til ionebytterkolonne og dermed ikke tørket og veid.



Figur 6.2 Karbohydratelueringprofil for SgC100 på Bio-Gel® P-6 DG. Området mellom linjene ble slått sammen til Sg100.

6.1.3. Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow

Fraksjonene Sg50 og Sg100 ble applisert på DEAE Sepharose® Fast Flow ionebytterkolonne for å separere nøytrale fra sure polysakkarider. Nøytrale polysakkarider ble eluert ut med destillert vann og identifisert ved hjelp av fenolsvovelsyretest. Fraksjonene ble kalt Sg50N og Sg100N. Sure polysakkarider ble eluert ut etter økende surhetsgrad ved hjelp av en NaCl-gradient fra 0 til 1,5 M. En fraksjon ble samlet fra hver av ekstraktene, Sg50°C Acidic (Sg50A) og Sg100°C Acidic (Sg100A). Karbohydratelueringprofilen ga ikke grunnlag for å dele opp ytterligere (Figur 6.3).

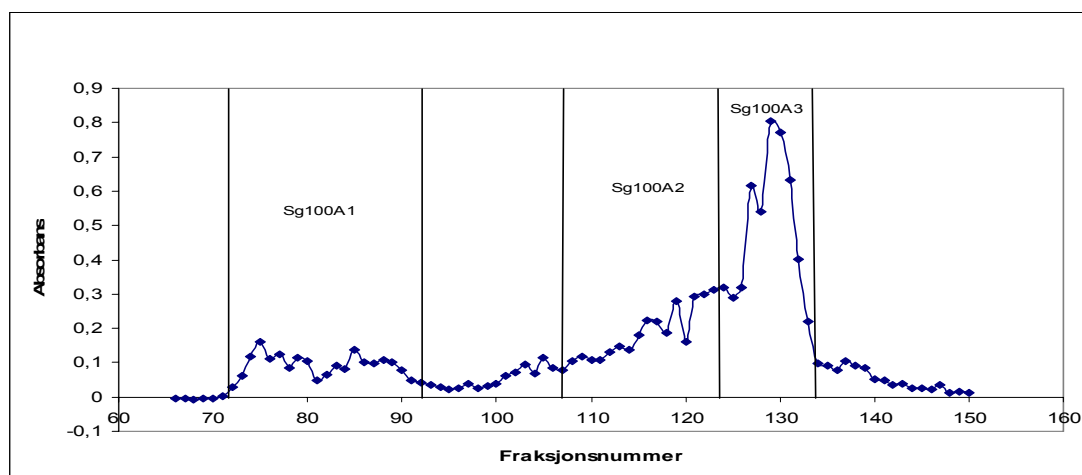


Figur 6.3 Karbohydrateluierungsprofilen til Sg100 på DEAE Sepharose® Fast Flow. Området mellom linjene ble samlet til Sg100A.

Eluatet etter eluering med 2 M NaCl ga ingen utslag i fenolsvovelsyretesten. Dette tyder på at de nøytrale (Sg50N og Sg100N) og sure (Sg50A og Sg100A) fraksjonene inneholdt hovedandelen karbohydrater. De nøytrale fraksjonene var fargeløse og de sure fraksjonene hadde en meget svak gulfarge. Dialysert og frysetørket veide Sg50A 0,106 g. Dette tilsvarer 0,05 % av utgangsmaterialet. Sg50N resulterte i svært lite materiale (< 1 mg) og det ble bestemt å ikke gå videre med denne. Dialysert og frysetørket veide Sg100N 91 mg. Dette tilsvarer 0,05 % av utgangsmaterialet. Vekten av frysetørket Sg100A var 3,380 g. Siden denne fraksjonen ikke var dialysert er det rimelig å anta at storparten er salt fra mobilfasen.

6.1.4. Gelfiltrering – Sephacryl S-400

Ytterligere separasjon og fraksjonering av Sg50A, Sg100A og Sg100N ble foretatt på en Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonne. I prøveopparbeidelsesfasen gikk ca 1/3 av Sg100A tapt. Dette må det tas hensyn til ved senere utbyttevurderinger. Fra Sg50A ble det samlet to fraksjoner, Sg50A1 og Sg50A2. Fra Sg100A ble samlet tre fraksjoner, Sg100A1, Sg100A2 og Sg100A3 (Figur 6.4). Fra Sg100N ble det kun tatt med én fraksjon videre, Sg100N1.



Figur 6.4 Karbohydratelueringprofil for første del av Sg100A på Sephadryl S-400. Områdene mellom linjene ble samlet til Sg100A1, Sg100A2 og Sg100A3.

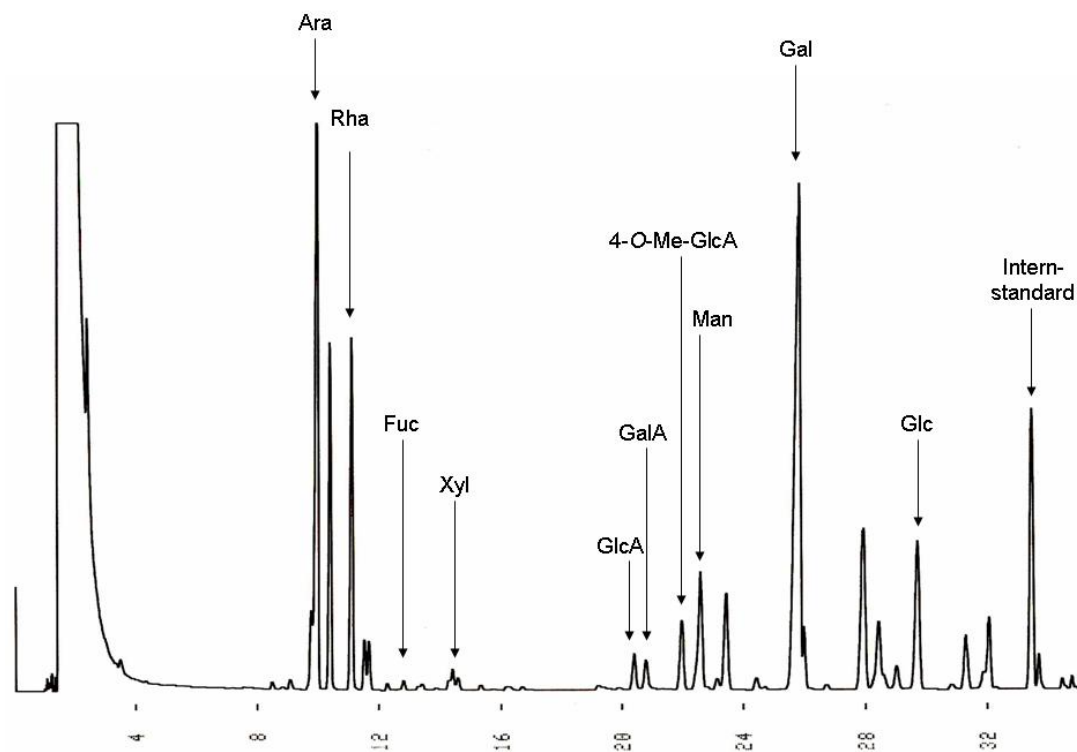
Tabell 6.1 viser utbytte av de forskjellige fraksjonene etter separasjon på Sephadryl S-400. Ekstraktene var så å si uten farge, bortsett fra Sg50A2 som etter frysetørrking hadde fått en lys grønn farge. Det ble antatt sannsynlig at dette var en forurensning som hadde kommet til, i og med at ingen antydning til fargen hadde vært observert tidligere.

Tabell 6.1 Utbytte etter separasjon på Sephadryl S-400

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
Sg50A1	7,5	$3,72 \times 10^{-3}$
Sg50A2	10	$4,96 \times 10^{-3}$
Sg100A1	6	$2,98 \times 10^{-3}$
Sg100A2	19	$9,42 \times 10^{-3}$
Sg100A3	32	$1,59 \times 10^{-2}$
Sg100N1	1	$5,0 \times 10^{-4}$

6.2. Karbohydratanalyse

6.2.1. Monosakkaridanalyse



Figur 6.5 Kromatogram for monosakkaridbestemmelse av Sg100A1. Karakteristiske topper for forskjellige monosakkarider er avmerket. Internstandard er mannitol.

Karbohydratsammensetningen av fraksjoner fra ionebytterkromatografi og gelfiltrering på Sephacryl S-400 ble bestemt ved metanolyse etterfulgt av TMS-derivatisering og GC-analyse. Hvert monosakkarid finnes i to eller flere konformasjoner og vil av den grunn kunne gi opphav til flere topper i kromatogrammet som danner monosakkaridspesifikke mønster. Figur 6.5 viser et kromatogram for monosakkaridbestemmelse av Sg100A1 der karakteristiske topper for forskjellige monosakkarider er avmerket.

Tabell 6.2 Karbohydratsammensetning av ekstrakter etter ionebytter og gelfiltrering (Sephacryl S-400). Verdiene er oppgitt som prosent av totalt karbohydratinhold.

	50A	50A1	50A2	100A	100A1	100A2	100A3	100N1
Ara	22,9	29,1	23,6	7,8	17,5	7,8	5,4	22,5
Rha	7,1	10,7	8,7	7,6	6,1	10,0	8,1	-
Fuc	0,5	0,3	0,6	0,7	0,2	0,9	0,7	0,3
Xyl	1,1	0,9	2,7	1,7	0,6	2,4	1,9	2,3
Man	6,7	5,4	8,3	0,7	5,2	0,5	0,7	31,7
Gal	32,7	23,9	34,6	9,9	32,5	11,9	10,9	10,0
Glc	5,3	6,9	3,8	2,9	7,3	2,8	4,1	33,1
4-O-Me-GlcA	3,5	6,1	-	-	7,9	-	-	-
GlcA	9,4	10,8	7,6	-	8,6	4,6	2,3	-
GalA	10,9	5,8	10,0	68,7	14,1	59,0	66,0	-

Tabell 6.2 viser karbohydratsammensetningen av ekstrakter fra ionebytter (Sg50A og Sg100A) samt fra gelfiltrering på Sephadex S-400 (Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1, Sg100A2, Sg100A3 og Sg100N1). Alle fraksjoner, bortsett fra Sg100N1 inneholder Ara, Gal, GalA og Rha som er typisk for pektintype polysakkarider.

Generelt inneholder fraksjonene isolert fra 50 °C vannekstrakt mer Ara, Man, Gal og noe mer GlcA enn ekstraktene fra 100 °C, men mindre GalA. Det høye innholdet av Ara og Gal, spesielt for 50 °C ekstraktene, kan tyde på innhold av arabinogalaktaner. Det kan i tillegg forekomme områder av ren Ara, kalt arabinan. Forekomst av Rha i tillegg til GalA i alle sure fraksjoner kan også tyde på innhold av rhamnogalakturonaner.

En pektinpolysakkaridfraksjon fra roten av *Bupleurum falcatum* kalt Bupleurum 2IIc (B2IIc) har blant annet vist potent effekt på komplementsystemet. Denne fraksjonen består av ca 70 % GalA med hårete områder bestående av en rhamnogalakturonan-hovedkjede med sidekjeder av nøytrale enheter av Gal og Rha bundet til Rha-enheter (Paulsen og Barsett 2005). De sure fraksjonene, da spesielt Sg100A, kan synes å ha en oppbygning lignende B2IIc med høyt GalA-innhold og også betydelige mengder Gal, Rha og Ara.

Verdiene for totalt karbohydratinhold beregnet ut fra internstandard var svært varierende. Samme undersøkelse med lik prøveopparbeidelse på ekstrakter fra andre

planter gjort i tilsvarende tidsrom har også vist svært varierende verdier for totalt sukkerinnhold. Samme internstandard er benyttet i alle prøvene og det mistenkes at de dårlig samsvarende resultatene kan skyldes forandringer i denne standardløsningen. Ny internstandard ble bestemt laget, men alle resultatene i denne oppgaven er gjort med den gamle. Verdiene for totalt karbohydratinnhold er det av denne grunn ikke tatt hensyn til i oppgaven. Det relative forhold mellom monosakkaridene antas å være riktig og vurderes deretter.

6.2.2. Bindingsforhold

Bindingsforhold mellom monosakkaridene i prøvene etter gelfiltrering på Sephacryl S-400 ble bestemt ved karboksylsyre-reduksjon med etterfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse.

Tabell 6.3 viser fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype. Mengdeforhold ble beregnet ut fra areal under kurven (AUC) i kromatogrammet og total AUC for alle monosakkarider i hver enkelt prøve. Topper som utgjorde < 1 % av totalinnholdet karbohydrat er utelatt fra Tabell 6.3 og videre diskusjon.

Terminal Glc, GlcA og 4-*O*-Me-GlcA har lik retensjonstid ved GC-analyse. Forholdet mellom Glc og GlcA/4-*O*-Me-GlcA ble bestemt fra forholdet mellom intensiteten av fraksjoneringsstoppene på henholdsvis 205 og 207 i massespekteret. Forholdet mellom GlcA og 4-*O*-Me-GlcA er det samme som sees etter metanolyse (Tabell 6.2).

Tabell 6.3 Fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype for prøver etter gelfiltrering på Sephacryl S-400. Verdiene er beregnet fra AUC og angis i prosent av total karbohydratmengde i prøven.

		Sg50A1	Sg50A2	Sg100A1	Sg100A2	Sg100A3	Sg100N1
Ara	Terminal	17,4	14,1	8,7	1,7	2,4	7,2
	1,3	3,4	3,3	0,8	0,0	0,4	3,7
	1,4/5 *	5,6	2,9	3,9	0,8	0,7	6,9
	1,3,5 **	2,7	2,4	3,3	5,0	1,7	3,3
	1,2,5 **		0,9	0,8	0,2	0,3	1,4
Fuc	Terminal			0,2	0,9	0,7	
Glc	Terminal		2,7	1,4	0,7		
	1,4	6,9	1,7	5,9	6,2	2,8	33,1
	1,4,6		0,6				
Rha	Terminal	4,2	3,9	1,4	4,3	3,5	
	1,2	3,7	2,9	2,6	3,4	2,0	
	1,3					1,2	
	1,2,4	2,8	1,9	2,1	2,3	1,4	
Gal	Terminal	1,9	4,5	4,0	3,9	4,3	2,7
	1,3	4,1	5,7	6,9	5,4	2,4	2,2
	1,6	2,7	6,3	2,8			
	1,3,4	0,7	1,5	1,9	1,4	2,7	
	1,3,6	12,4	12,3	14,6	1,2	1,5	2,8
	1,3,4,6	2,1	4,1	2,3			2,3
Xyl	Terminal	0,9	1,6	0,3	0,9	1,2	1,0
	1,4		1,1	0,3	1,5	0,7	1,3
GlcA	Terminal	10,8	7,6	8,6	4,6	2,3	
	4-O-Me-	6,1		7,9			
GaIA	1,4	5,8	10,0	14,1	59,0	66,0	

*Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at dette er 1,5-bundet Ara og ikke 1,4-bundet.

** Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at 1,3,5-bundet Ara har kortere retensjonstid enn 1,2,5-Ara.

Fraksjonering av 1,4- og 1,5-bundet Ara gir samme fraksjoneringsmønster. Tidligere erfaring har vist at monosakkarider i denne toppen har blitt borte ved svak syrehydrolyse. Dette tyder på at toppen består av 1,5-Ara siden, 1,4-Ara ville vært på pyranoseform og dermed langt mer motstandsdyktig mot sur hydrolyse.

Ara bundet 1,5 og forgrenet i C2 eller C3 er også vanskelig å skille ved GC-MS. Også her kan det på bakgrunn av tidligere erfaring med rimelig sikkerhet antas at 1,2,5-Ara retarderes i større grad i GC-systemet og dermed kommer ut etter 1,3,5-Ara.

Terminal Xyl sitter som regel i sidekjeder eller direkte ved forgreningspunkter av GalA. Siden forgrenet GalA ikke forekommer i noen av prøvene kan det antas at terminal Xyl kun sitter på sidekjeder.

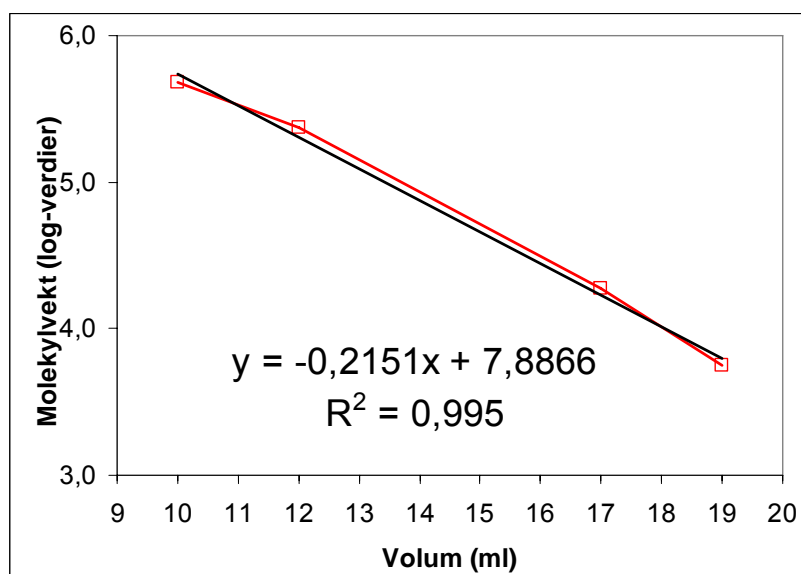
Alle sure fraksjoner inneholder > 20 % terminale monosakkarider, og tilsvarende mange forgreningspunkter. Dette betyr at store deler av polysakkaridene er hårete områder med korte, forgrenede sidekjeder. Det relativt like forholdet mellom Rha og GalA i fraksjoner fra 50 °C og forekomst av begge i 100 °C-fraksjonene kan tyde på rhamnogalakturenanområder. Forekomst av 1,3- og 1,6-Gal i tillegg til forgrenede Gal-enheter er sammen med terminal og 1,5 bundet Ara er typisk for AG II. Dette kan sees spesielt for Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1 og Sg100A3. Det er kjent at hårete områder ofte består av RG I med AG II-sidekjeder. Hårete områder fra rhamnogalakturenaner har vist seg påvirke både den klassiske og den alternative aktiveringsveien i humant komplementsystem (Paulsen og Barsett 2005, Taiz og Zeiger 1998, Yamada og Kiyohara 1999). Både Sg50A1, Sg50A2 og Sg100A1 viste høyere aktivitet enn PM II ved komplementfikseringstesten (seksjon 6.3.1).

Metyleringsanalyser av B2IIc, en sur fraksjon fra *B.falcatum*, viser flere likhetstrekk med de sure fraksjonene fra *S.guineense*. Blant annet kan det høye innholdet av 1,4-GalA, da spesielt i Sg100A2 og Sg100A3 (henholdsvis 59 % og 66 %), gjenkjennes i B2IIc (64,9 %). Dette høye innholdet skyldes trolig homogalakturenanområder. På grunn av mangel på prøvemateriale var det ikke mulig å undersøke disse to fraksjonene videre, for eksempel ved enzymatisk degradering med polygalakturenanase.

Den høye forekomsten av forskjellige typer Ara i Sg100N1 kan tyde på innhold av arabinaner. Disse arabinaner er sannsynligvis relativt komplekse med mange forgreninger på grunn av det høye innholdet terminal og forgrenet Ara. Trolig foreligger ikke arabinaner fritt i naturen, men er bundet til galaktaner (Paulsen og Barsett 2005). Dette stemmer godt overens med innhold av Gal i Sg100N1.

6.2.3. Molekylvektsdistribusjon

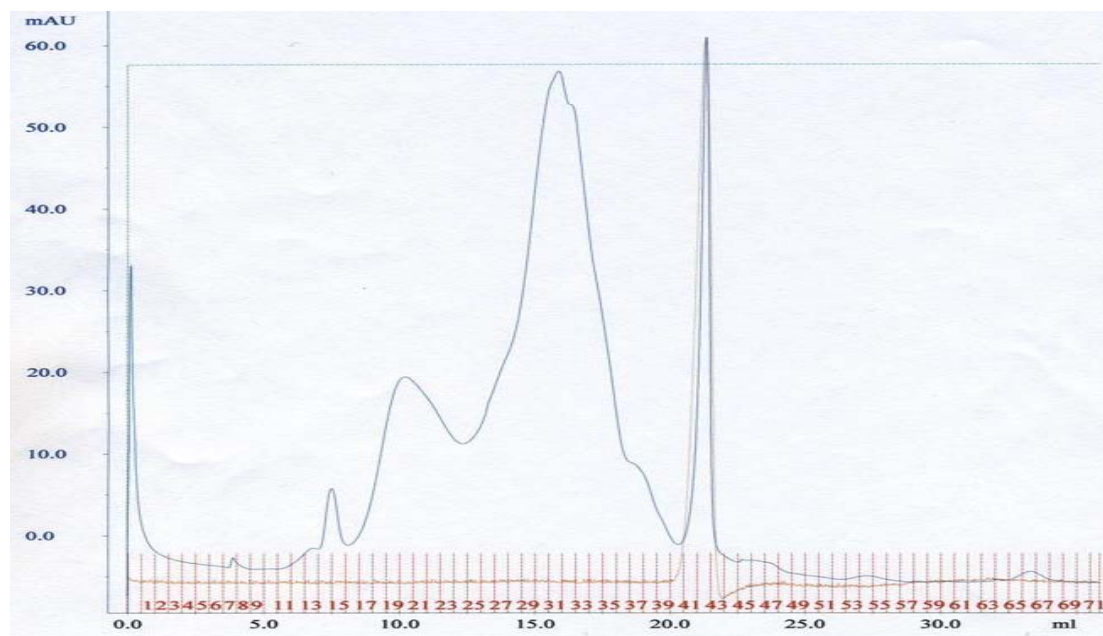
Undersøkelse av molekylvektsdistribusjon ble gjort ved hjelp av FPLC. Grunnet svært lite tilgjengelig prøvemateriale ble kun Sg50A og Sg100A undersøkt. I tillegg til prøvene ble det kjørt dekstranstandarder med kjent molekylvekt (M_w) under samme forhold. Det ble laget en lineær semilogaritmisk standardkurve ut fra toppmaksimum for hvert av dekstranene. Molekylvektsdistribusjon for prøvene ble beregnet ved hjelp av funksjonen for en lineær regresjonslinje til kurven. Figur 6.6 viser standardkurven og funksjonen for regresjonslinjen. Karbohydratelueringprofilen for dekstranene ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten.



Figur 6.6 Standardkurve for FPLC av dekstraner med molekylvekt 475 kDa, 233 kDa, 19kDa og 5,6 kDa plottet semilogaritmisk mot elueringsvolum til toppmaks.

Til beregning av molekylvektsdistribusjon for prøvene ble kromatogrammene fra UV-detektoren benyttet. I utgangspunktet detekteres kun sure polysakkarider, men ved å redusere bølgelengden, som her til 214 nm, økes sensitiviteten. Dette gjelder også for

andre stoffer tilstede i prøven. Sammenligning med karbohydratelueringprofilen fra fenolsvovelsyretesten viste hvilke av toppene i UV-kromatogrammene som gjenspeilet polysakkarider og beregningen ble gjort ut fra dette.



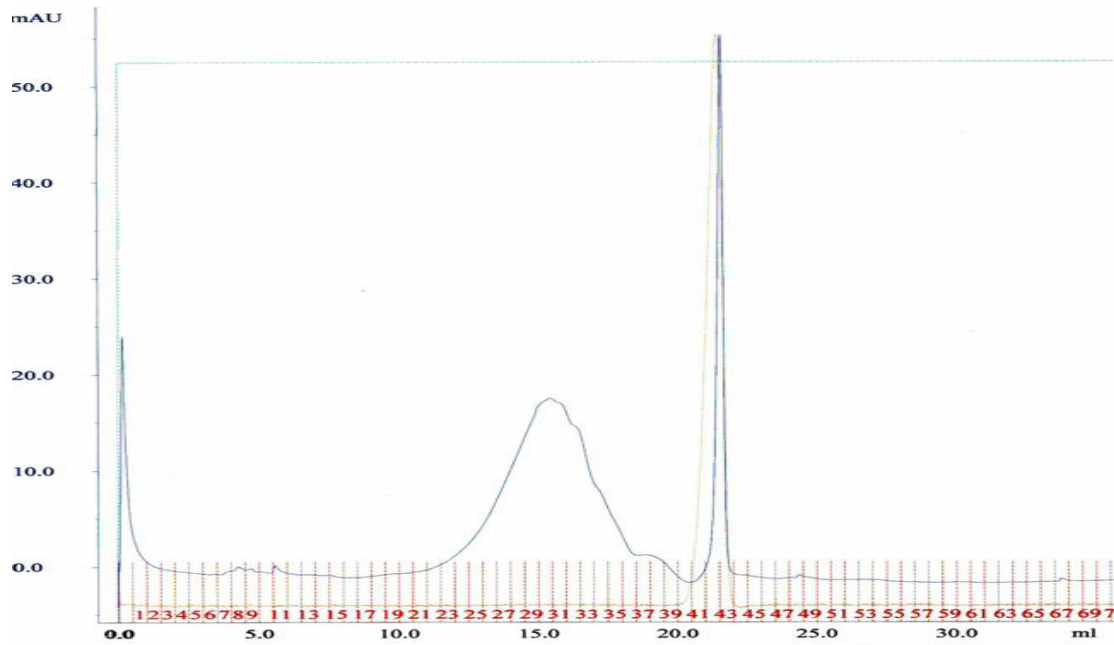
Figur 6.7 Kromatogram for Sg50A på FPLC.

Kromatogrammet for Sg50A (Figur 6.7) viser to topper som inneholder karbohydrater med toppmaksimum ved henholdsvis ca 10 ml og 15,5 ml. Dette kan tyde på at prøven er heterogen og inneholder karbohydrater i to størrelsesfraksjoner. Estimert molekylvekt for fraksjonene i Sg50A er vist i Tabell 6.4. Toppene ved ca 7,5 og 21,5 ml viste ved fenolsvovelsyretesten ikke å inneholde karbohydrater. På grunn av ingen eller svært dårlig grunnlinjeseparasjon er molekylvekten kun beregnet ut fra toppmaksimum. Fra kromatogrammet er det rimelig å anta at distribusjonen for hver av toppene er betydelig på hver side av toppmaksimum, men usikkerheten ved beregning av disse antas for stor til at beregningene vil ha noen verdi. Topp nummer to er størst. Dette betyr at den største størrelsesfraksjonen er distribuert rundt 36 kDa.

Tabell 6.4 Estimert molekylvekt (M_w) i Da ved toppmaksimum for Sg50A.

	M_w (Da)
Topp 1	$5,48 \times 10^5$
Topp 2	$3,58 \times 10^4$

Figur 6.8 viser kromatogrammet for Sg100A etter separasjon på FPLC. Sg100A viser en tydelig mer homogen molekylvektsdistribusjon enn Sg50A. Toppen etter ca 21,5 ml viste ikke innhold av karbohydrater ved fenolsvovelsyretest.



Figur 6.8 Kromatogram for Sg100A på FPLC.

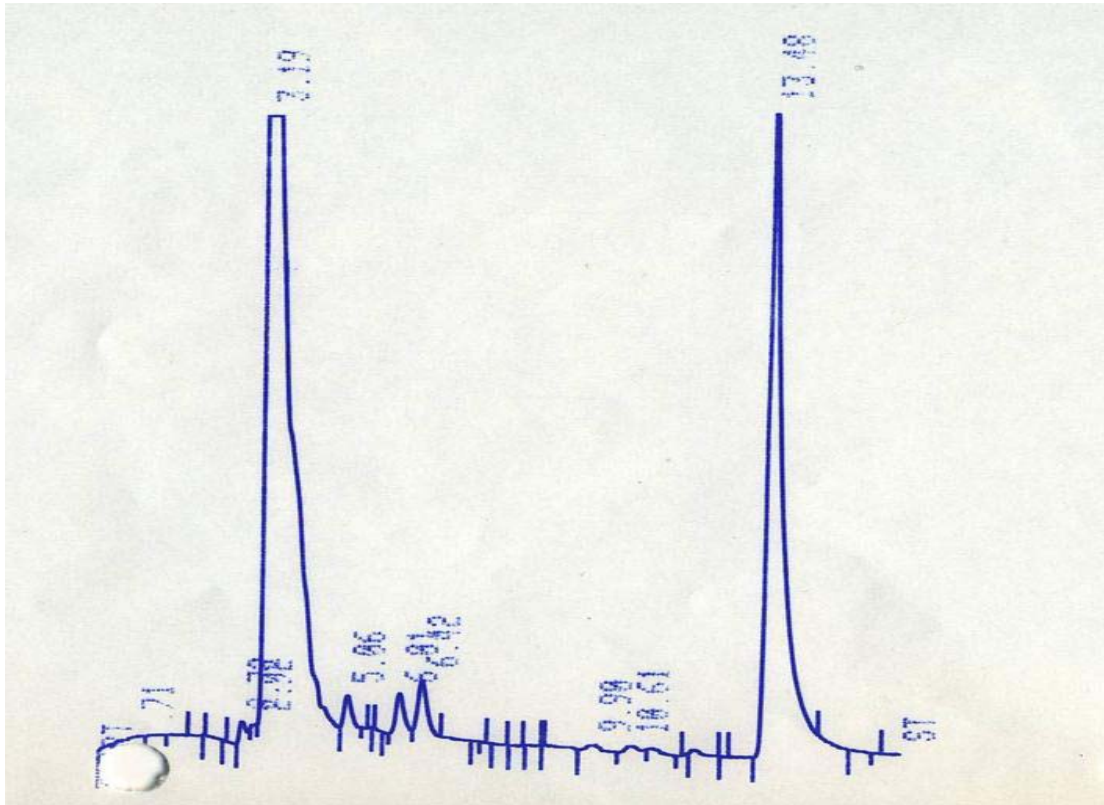
Sg100A viser en molekylvektsdistribusjon på mellom 260 kDa og 6 kDa med toppmaksimum og dermed hovedandelen karbohydrater ved ca 46 kDa (Tabell 6.5).

Tabell 6.5 Molekylvektsdistribusjon for Sg100A.

	Mw (Da)
Høyeste Mw	$2,60 \times 10^5$
Mw toppmaksimum	$4,59 \times 10^4$
Laveste Mw	$6,32 \times 10^3$

Til sammenligning viste B2IIc-fraksjonen fra *B.falcatum* ved analyse på HPLC en molekylvekt på 63 kDa (Yamada, *et al.* 1991). Dette er i samme størrelsesorden som både Sg50A og Sg100A. Dette stemmer for øvrig overens med resultater diskutert i seksjon 6.2.1 og 6.2.2.

6.2.4. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold



Figur 6.9 Kromatogram for bestemmelse av DMe og DAc for Sg50A parallell 1.

På grunn av relativt høyt innhold av galakturonsyrer i fraksjon Sg50A og Sg100A ble esterifiseringsgrad av metanol (DMe) og eddiksydre (DAc) bestemt. Mangel på prøvemateriale medførte at kun disse prøvene ble undersøkt. Figur 6.9 viser kromatogrammet for Sg50A parallell 1. Toppen med retensjonstid 6,42 representerer eddiksyre. Metanolinnholdet lar seg ikke bestemme siden toppen kommer inn i den store forurensningstoppen med retensjonstid 3,19. Toppen ved 13,48 representerer internstandard, isopropanol.

Tabell 6.6 DAc for Sg50A og Sg100A.

Fraksjon	DAc, % av totalt sukkerinnhold	DAc, % av totalt GalA-innhold
Sg50A	> 1,8	> 16,5
Sg100A	> 0,9	> 1,2

Tabell 6.6 viser DAc for Sg50A og Sg100A både med hensyn på totalt sukkerinnhold og GalA. Som nevnt over for Sg50A, kom metanoltoppen for begge fraksjonene trolig

inn under den store forurensningstoppen i front. Dette tyder på at denne metoden ikke egner seg for bestemmelse av DME i så heterogene prøver. Det kan tenkes at en metode som benytter seg av GC-analyse kan være bedre egnet for undersøkelse av metanolinnhold.

Siden monosakkaridanalysen (seksjon 6.2.1) ikke ga et totalt karbohydratinnhold, lar det seg vanskelig gjøre å beregne DAc i forhold til totalt sukkerinnhold. Verdiene i Tabell 6.6 baserer seg derfor på at prøvene er helt rene, det vil et karbohydratinnhold på 100 %. Siden vi vet at innholdet er lavere enn dette kan vi kun si at DAc av totalt sukkerinnhold er $> 1,8 \%$ og $> 0,9 \%$ for henholdsvis Sg50A og Sg100A.

DAc med hensyn på mengde GalA i prøven baserer seg også på et antatt karbohydratinnhold på 100 %. Det vil si at DAc i forhold til GalA-innhold for Sg50A og Sg100A er henholdsvis $> 16,5 \%$ og $> 1,2 \%$.

6.3. Biologisk aktivitet

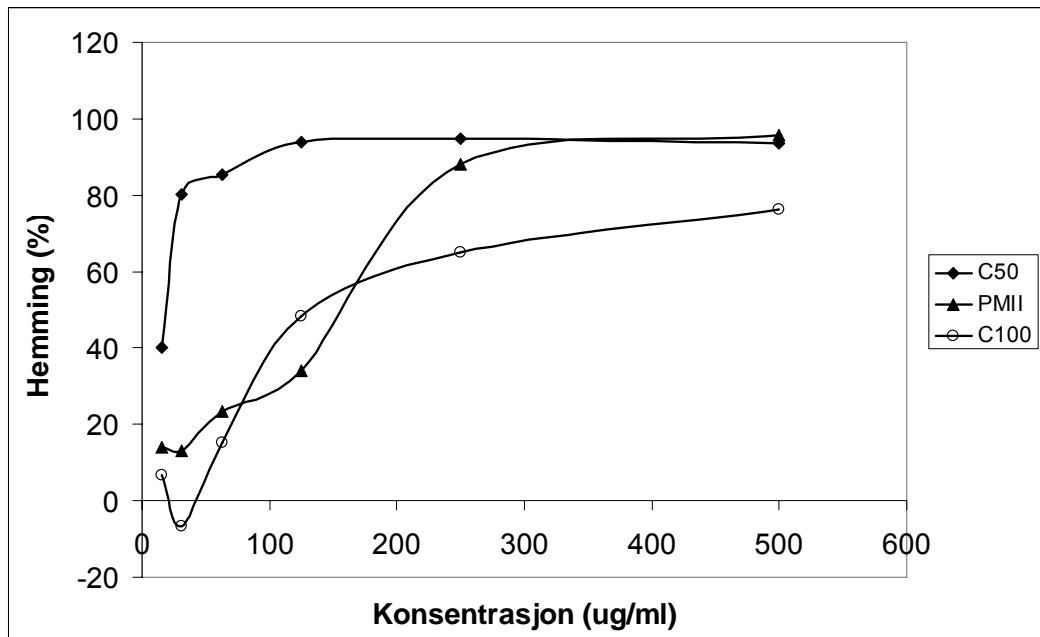
6.3.1. Komplementfiksering

En metode for å undersøke fraksjoners biologiske aktivitet er måling av *in vitro* effekt på det humane komplementsystem. Prøvene som testes kan påvirke enkelte komplementfaktorer som igjen fører til redusert evne til å lysere røde blodceller.

Aktivitet i testen måles i prosent inhibering av hemolyse og en viktig parameter for testen er ICH_{50} . ICH_{50} er den konsentrasjonen av en prøve som gir 50 % hemming av hemolyse. Bruk av ICH_{50} har mange begrensninger, spesielt siden det er store variasjoner i mange faktorer i testsystemet fra dag til dag. I tillegg til ICH_{50} bør derfor også det relative forholdet til PM II tas i betraktning ved vurdering av resultater.

Testen er ikke i stand til å skille aktivering og hemming av komplementsystemet.

Plantago major, fraksjon II (PM II) ble benyttet som positiv kontroll (Samuelsen, *et al.* 1996). For alle undersøkte ekstrakter ble testen gjennomført to ganger.



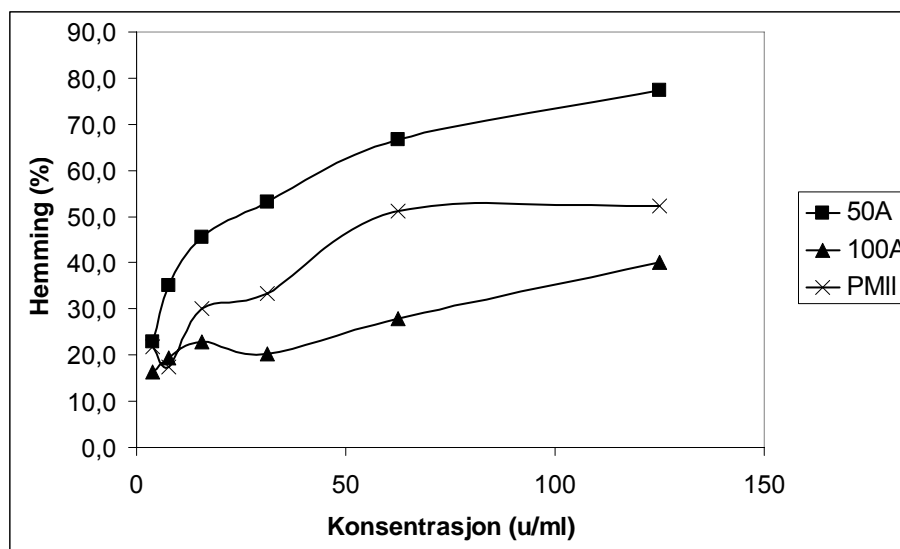
Figur 6.10 Komplementfikserende aktivitet av SgC50 og SgC100.

Figur 6.10 og Tabell 6.7 viser aktivitet av råekstraktene SgC50 og SgC100 sammenlignet med PMII. Begge ekstraktene har lavere ICH_{50} -verdi enn PM II, noe som tyder på høyere aktivitet. SgC50 er i tillegg tydelig mer aktivt enn SgC100. Basert på grafen og ICH_{50} - verdien for Sg100 er det vanskelig å si noe klart om aktivitet i forhold til PM II.

Tabell 6.7 ICH_{50} -verdier for SgC50, SgC100 og PMII korresponderende med Figur 6.10.

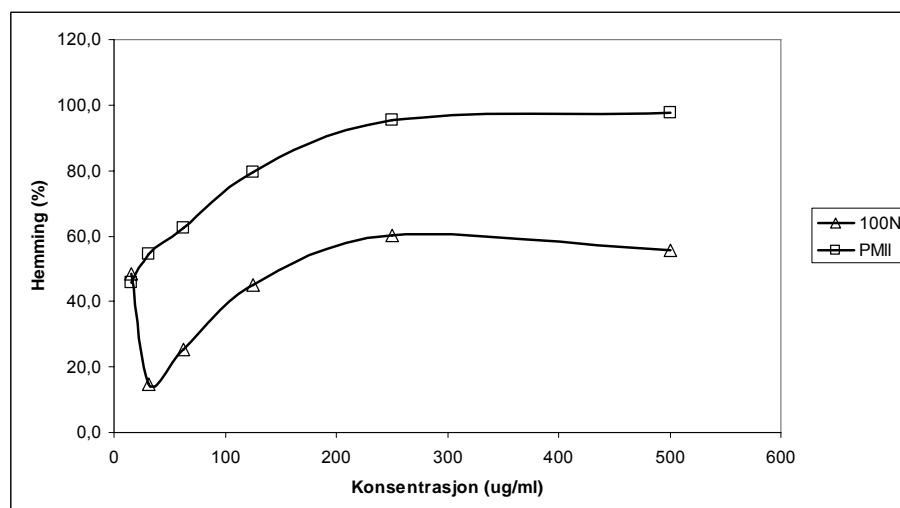
Ekstrakt	ICH_{50} (µg/ml)
SgC50	18,5
SgC100	134,5
PM II	154,8

Figur 6.11 viser komplementfikserende aktivitet av de sure ekstraktene Sg50A og Sg100A. Sg50A viser høy aktivitet med ICH_{50} på 23,4 µg/ml sammenlignet med PMII med ICH_{50} på 59,4 µg/ml. ICH_{50} -verdi for Sg100A kunne ikke beregnes siden hemmingen ikke nådde 50 % for de konsentrasjonene brukt i testen, men aktiviteten er tydelig lavere enn den av PM II.



Figur 6.11 Komplementfikserende aktivitet av Sg50A og Sg100A etter ionebytterkromatografi.

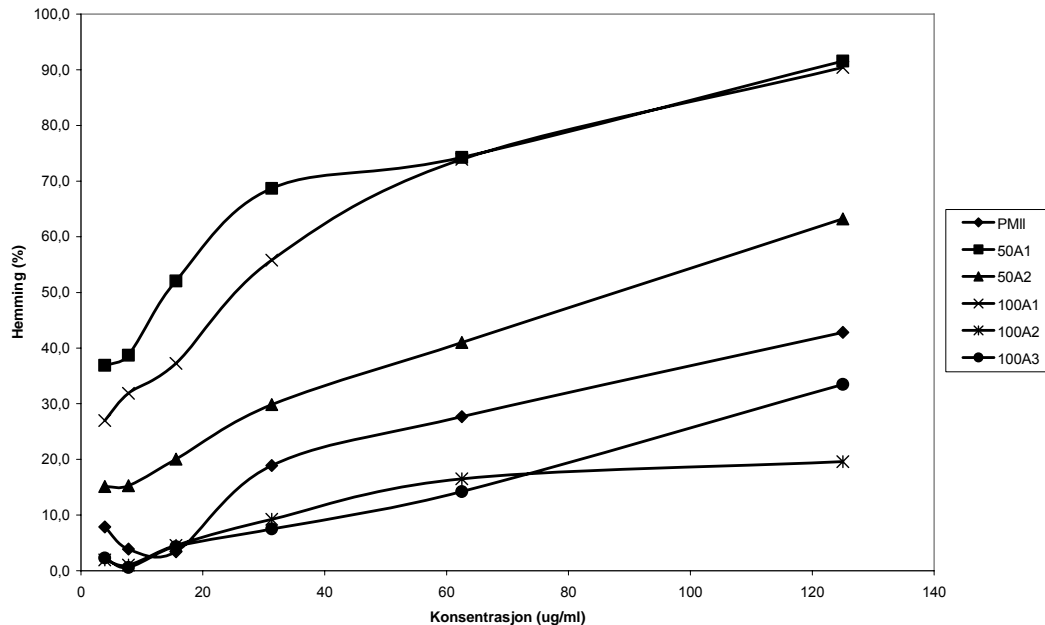
Figur 6.12 viser komplementfikserende effekt av Sg100N. ICH₅₀-verdiene av Sg100N og PM II på henholdsvis 156,5 µg/ml og 22,0 µg/ml tyder på at Sg100N påvirker komplementsystemet i mindre grad enn PM II. Grafen (Figur 6.12) viser også en lavere hemmingsprofil for Sg100N.



Figur 6.12 Komplementfikserende aktivitet av Sg100N etter ionebytterkromatografi.

Figur 6.13 viser komplementfikserende aktivitet av Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1, Sg100A2 og Sg100A3. De høymolekylære fraksjonene Sg50A1 og Sg100A1, med ICH₅₀-verdier på henholdsvis 14,0 µg/ml og 25,2 µg/ml, viser høyere aktivitet enn PM II og de andre ekstraktene. Også Sg50A2 viser noe høyere aktivitet enn PM II med ICH₅₀-verdi på 82,8 µg/ml. For PM II lar det seg ikke gjøre å beregne ICH₅₀-verdi

siden konsentrasjonene brukt i forsøket ikke ga 50 % hemming. Sg100A2 og Sg100A3 synes å ha lavere aktivitet enn PM II.



Figur 6.13 Komplementfikserende aktivitet av sure ekstrakter etter gelfiltrering på Sephacryl S-400.

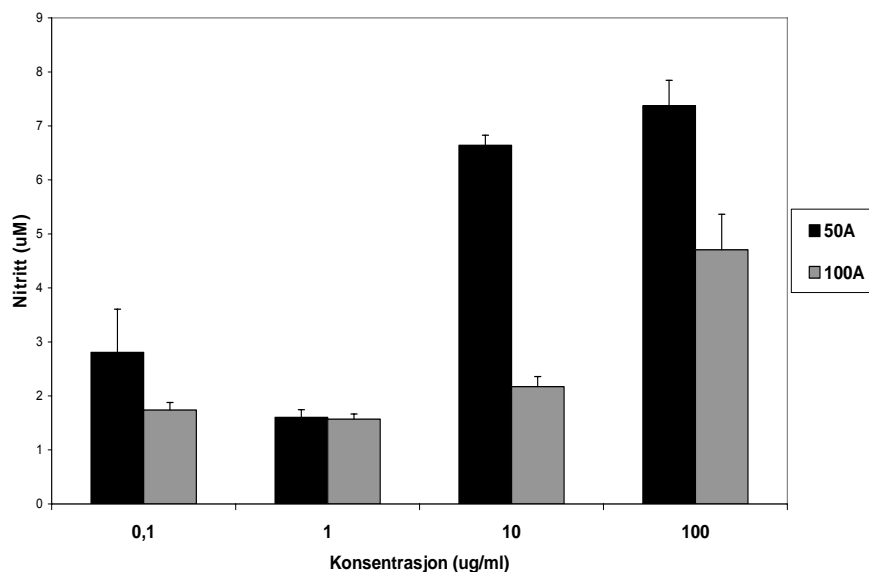
Sg50A1, Sg50A2 og Sg100A1 viser høyere aktivitet enn PM II i tillegg til de andre fraksjonene testet. I seksjon 6.2.2 ble det foreslått at disse fraksjonene kunne inneholde hårete rhamnogalakturonanområder. Dette er strukturer som tidligere har vist sammenheng med aktivering av to av aktiveringsveiene for komplementsystemet (Yamada og Kiyohara 1999).

6.3.2. Makrofagstimulering

Når makrofager aktiveres utskilles rekke mediatorer. En av disse er NO som omdannes til nitritt, en betydelig mer stabil forbindelse. Griess-reagenssystemet gjør det mulig å detektere nitritt, og ved hjelp av standardkurver fra kjente nitrittkonsentrasjoner kan nitrittnivået fra prøvene bestemmes.

Figur 6.14 viser resultatene for nitrittmåling av Sg50A og Sg100A. Disse ekstraktene ble undersøkt siden de sure fraksjonene hadde vist aktivitet i komplementfikseringstesten. På grunn av mangel på prøvemateriale ble ingen av de mer rensede prøvene undersøkt. Testen ble gjennomført én gang daglig i tre påfølgende dager. Resultatene fra dag to viste ingen aktivitet, og Figur 6.14 illustrerer derfor kun testene

fra dag én og tre. Ingen åpenbare årsaker ble identifisert for den manglende aktiviteten fra dag to.



Figur 6.14 Nitrittmåling for Sg50A og Sg100A

Resultatene i Figur 6.14 tyder på at det er en sammenheng mellom prøvekonsentrasjon og NO-utskillelse fra makrofagene, noe som er en sterk indikator på at *S.guineense* har makrofagstimulerende effekt. Sg50A synes å stimulere makrofager i større grad enn Sg100A, noe som er i tråd med fraksjonenes effekt på komplementsystemet (Figur 6.11). Den relativt lille forskjellen mellom 10 µg/ml og 100 µg/ml for Sg50A kan indikere at et slags metningspunkt for påvirkning er nådd.

6.4. Strukturoppklaring ved enzymatisk degradering

Innhold av Ara, Gal og Rha i tillegg til GalA i Sg50A1 og Sg100A1 kan tyde på at polysakkaridene er av pektintype (Tabell 6.2). Forgrenede områder av pektiner kan isoleres ved å behandle polysakkaridene med pektinase etter deesterifisering av GalA. På bakgrunn av at Sg50A1 og Sg100A1 begge viste høy aktivitet i komplementfikseringstesten (Figur 6.13), ble det bestemt å gjennomføre enzymatisk degradering av disse fraksjonene for kartlegging av struktur/aktivitetsforhold. Analyse av bindingsforhold og monosakkaridsammensetning var ikke gjennomført ved enzymdegraderings start. Valg av enzym ble basert på at de sure fraksjonene, da spesielt Sg100A, hadde et høyt innhold av GalA (Tabell 6.2). På bakgrunn av resultatene fra bindingsforholdsanalysen (Tabell 6.3), som blant annet viste høyt

innhold av terminal Ara for både Sg50A1 og Sg100A1, kunne muligens et annet enzym vært valgt. Arabinofuranosidase spalter ikke-reduserende Ara-ender og vil trolig egnet seg bedre i forhold til polysakkaridenes sammensetning.

6.4.1. Enzymatisk degradering

4 mg Sg50A1 og 3 mg Sg100A1 ble degradert med endo-polygalakturonanase etter deesterifisering. Etter degradering ble prøvene applisert på PD-10-kolonne og de store hårete områdene ble separert fra de mindre avspaltede GalA-forbindelsene.

Elueringsprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten. På grunn av små mengder prøve ble det kun samlet med én fraksjon for hver prøve, Sg50A1E og Sg100A1E. Prøvene ble frysetørket og tatt videre til metanolyse, metylering og komplementfiksering.

6.4.2. Karbohydratsammensetning

Karbohydratsammensetning for de enzymatisk degraderte fraksjonene ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Tabell 6.8 viser en oversikt over karbohydratsammensetningen for fraksjonene før og etter enzymdegradering. Det faktum at enzymdegraderingen ikke har redusert andelen GalA, heller det motsatte, kan tyde på at enzymet ikke har virket som ønsket. Det kan være flere grunner til dette. Polysakkaridene har i tidligere undersøkelser vist seg å ha store komplekse områder med forgreninger, noe som kan gjøre det vanskelig for enzymene å komme til. Hadde molekylene inneholdt større homogalakturonanområder ville trolig enzymene virket bedre og større endringer kunne vært observert.

Økningen i andel Gal for Sg50A1E indikerer likevel at enzymene har hatt en viss effekt. Andelen av de andre monosakkaridene er i langt mindre grad endret, noe som kan tyde på fjerning av disse i relativt like mengder. Ut fra hva som allerede er kjent om strukturen av polysakkaridene er det vanskelig å si noe mer om effekt og følger av degraderingen.

Tabell 6.8 Karbohydratsammensetning etter enzymatisk degradering. Sg50A1E og Sg100A1E sammenlignet med Sg50A1 og Sg100A1.

	Sg50A1	Sg50A1E	Sg100A1	Sg100A1E
Ara	29,1	21,3	17,5	24,8
Rha	10,7	6,5	6,1	12,9
Fuc	0,3	0,3	0,2	0,5
Xyl	0,9	1,4	0,6	2,9
Man	5,4	4,4	5,2	1,5
Gal	23,9	42,2	32,5	28,4
Glc	6,9	5,4	7,3	3,1
4-O-Me-GlcA	6,1	3,6	7,9	1,8
GlcA	10,8	8,0	8,6	6,7
GalA	5,8	7,1	14,1	17,4

6.4.3. Bindingsforhold

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de enzymdegraderte polysakkaridfraksjonene ble bestemt ved karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse. Prosentvis innhold av de forskjellige monosakkaridene med ulike bindingstyper for de enzymdegraderte fraksjonene sammenlignet med Sg50A1 og Sg100A1 er vist i Tabell 6.9.

Som diskutert i seksjon 6.4.2 kan det synes som enzymene brukt i degraderingen har hatt liten effekt. I tillegg er effekten som er observert, vanskelig å forklare.

Den kraftige økningen i andelen 1,4-Glc i begge fraksjoner er det rimelig å anta skyldes forurensning. For Sg50A1E kan økningen i andel i forgrenede Gal-enheter tyde på at andel komplekse, forgrenede AG II-områder polysakkaridene etter degradering er økt.

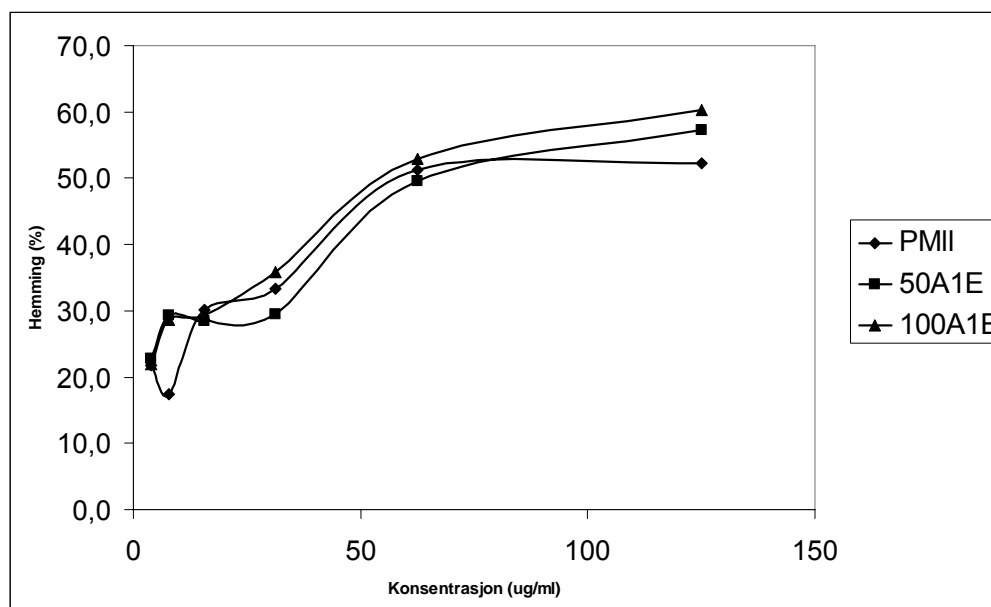
Tabell 6.9 Bindingsforhold etter enzymdegradering for Sg50A1E og Sg100A1E sammenlignet med Sg50A1 og Sg100A2.

		Sg50A1	Sg50A1E	Sg100A1	Sg100A1E
Ara	Terminal	17,4	12,7	8,7	16,5
	1,3	3,4	2,5	0,8	0,3
	1,4/5 *	5,6	4,1	3,9	5,2
	1,3,5 **	2,7	1,9	3,3	1,8
	1,2,5 **			0,8	1,0
Fuc	Terminal			0,2	
Glc	Terminal			1,4	1,4
	1,4	6,9	5,4	5,9	1,7
	1,4,6				
Rha	Terminal	4,2	2,5	1,4	4,0
	1,2	3,7	2,3	2,6	5,3
	1,3				
	1,2,4	2,8	1,7	2,1	3,6
Gal	Terminal	1,9	3,3	4,0	6,8
	1,3	4,1	7,3	6,9	6,4
	1,6	2,7	4,8	2,8	1,4
	1,3,4	0,7	1,3	1,9	
	1,3,6	12,4	21,9	14,6	13,8
	1,3,4,6	2,1	3,7	2,3	
Xyl	Terminal	0,9	1,4	0,3	2,9
	1,4			0,3	
GlcA	Terminal	10,8	8,0	8,6	6,7
	4-O-Me-	6,1	3,6	7,9	1,8
GalA	1,4	5,8	7,1	14,1	17,4

*Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at dette er 1,5-bundet Ara og ikke 1,4-bundet.

** Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at 1,3,5-bundet Ara har kortere retensjonstid enn 1,2,5-Ara.

6.4.4. Biologisk aktivitet



Figur 6.15 Komplementfikserende aktivitet av de enzymdegraderte ekstraktene Sg50A1E og Sg100A1E.

Biologisk aktivitet for de enzymdegraderte ekstraktene Sg50A1 og Sg100A1E ble undersøkt ved komplementfikseringstesten. Figur 6.15 viser komplementfikserende aktivitet for Sg50A1E og Sg100A1E. ICH_{50} -verdiene for de to ekstraktene er henholdsvis 65,3 $\mu\text{g/ml}$ og 55,3 $\mu\text{g/ml}$, og 59,5 $\mu\text{g/ml}$ for PMII. Aktiviteten for begge ekstrakter kan ikke skilles fra PMII (Figur 6.15). Dette kan tyde på noe tap av aktivitet i enzymdegradering, siden både Sg50A1 og Sg100A1 hadde tydelig høyere aktivitet enn PM II (Figur 6.13). Det er noe uklart hva som har ført til dette.

7. Etnofarmakologiske studier i Mali

7.1. Etnofarmakologi

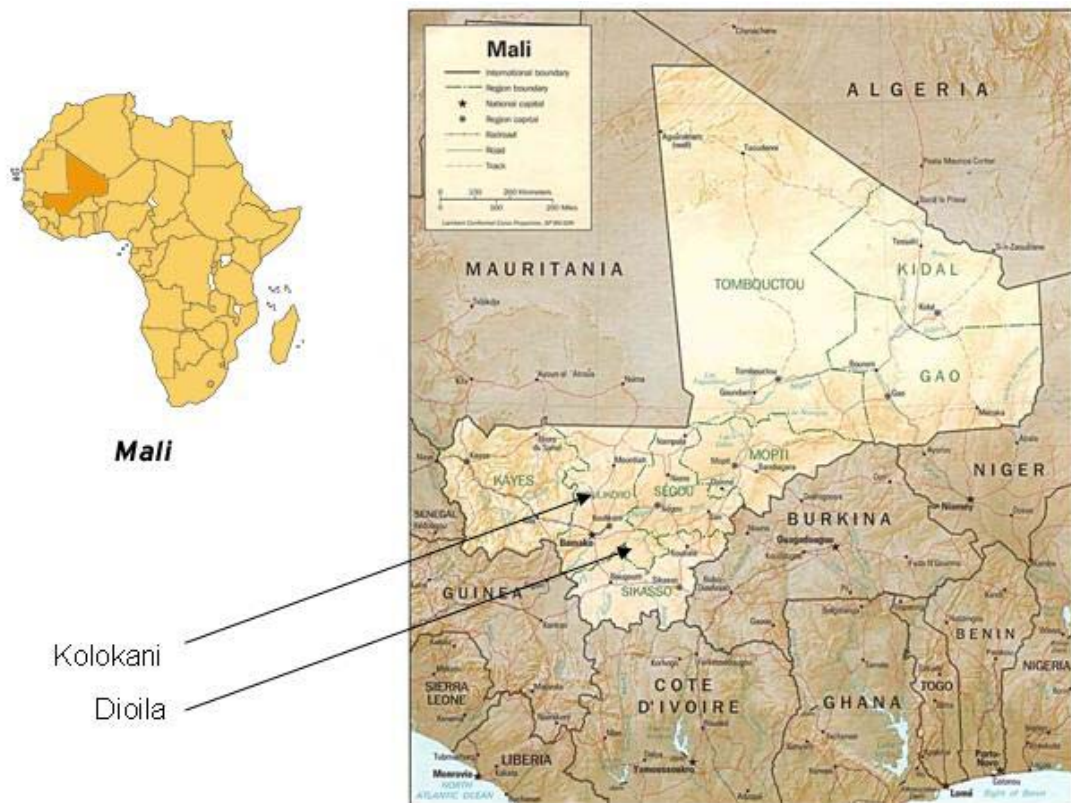
Ulike kulturers bruk av planter til forskjellige formål kalles etnobotanikk. Etnofarmakologi er en underdisiplin til etnobotanikk som tar for seg kulturers tradisjonelle bruk av planter til medisinske formål. Ved å samle informasjon vedrørende tradisjonell bruk, tenker man at sjansene øker for å finne farmakologisk aktive substanser (Schultes 1994). Mange viktige legemidler som er i bruk i dag ble opprinnelig oppdaget på bakgrunn av tradisjonell medisinsk bruk av planter. Blant disse kan nevnes opiat, kinin, vinkristin og digitalis-glykosider (Cox og Balick 1994). Tverrfaglig samarbeid er en av nøklene i etnofarmakologisk forskning, der prosesser som identifikasjon, innhøsting, karakterisering av innholdsstoffer og aktivitetstesting er prosesser som krever spesialkompetanse fra forskjellige fagfelter. Ofte involveres ressurser med bakgrunn fra medisin, sosialantropologi, botanikk, biologi, farmakologi og en rekke andre disipliner i etnofarmakologisk arbeid (Heinrich og Gibbons 2001).

7.2. Mali

Mali er et stort land i Vest-Afrika (Figur 7.1). I utstrekning er Mali Afrikas femte største land, men det har en populasjon på kun rundt 12 millioner. Etter Malis løsrivelse fra Frankrike i 1960 har landet vært under diktatorisk styre frem til 1991. Alpha Konare ble Malis første demokratisk valgte president. Etterfølgeren, Amadou Touré, som ble valgt i 2002, er regjerende president (CIA 2006).

I følge FNs Human Development Index fra 2005, hvor vurdering levestandard, utdannelse og gjennomsnittsalder ligger til grunn, er Mali rangert som 174 av totalt 177 land (United-Nations-Development-Program 2005). Mali er dermed et av verdens fattigste land. 65 % av arealet er ørken eller halvørken og inntektsdistribusjonen er svært skjev. Mali er sterkt avhengig av utenlandsk bistand og er svært sårbare ovenfor fluktasjoner i verdensmarkedets gull- og bomullspriser. Til tross for en gjennomsnittlig økonomisk vekst på rundt 5 % fra 1996-2005, har uroligheter i

omkringliggende land, da spesielt i Elfenbenskysten, vanskeliggjort videre utvikling (United-Nations-Development-Program 2005).



Figur 7.1 Mali ligger i Vest-Afrika (Africa-Expedition 2006, Africare 2006)

7.3. Tradisjonell medisin i Mali

I Mali bor 70 % av befolkningen i rurale områder med svært begrenset tilgang på moderne legesentra. Prisen på konvensjonelle legemidler er i tillegg svært høy sammenlignet med inntektsnivå. Mali har en legedekning på 4 leger per 100 000 innbyggere. Til sammenligning har Norge 356 per 100 000. Dette gjør tradisjonell medisin svært viktig for en stor del av den maliske befolkningen. Også i urbane strøk står den lokale tradisjonelle medisinen sterkt, noe som i stor grad skyldes pris og tradisjon (United-Nations-Development-Program 2005).

Infeksjonssykdommer, parasitter og feilernæring er viktige helseproblemer i Mali. Høy spedbarnsdødelighet (123 per 1 000 levende fødte) og lav forventet levealder (47,8 år) kan i stor grad tilskrives de ovennevnte problemene (United-Nations-Development-Program 2005). Malis regjering har forstått viktigheten av et lokalbasert

helsesystem, samtidig som de bevisst har tatt vare på lokalkunnskaper og tradisjon. Dermed har de oppnådd økt tilgjengelighet, både geografisk og økonomisk, til helsetjenester for den generelle befolkningen (Diallo og Paulsen 2000). Det som i dag heter Département de Médecines Traditionnelles (DMT) har, siden 1973, arbeidet med å bedre den generelle folkehelsen ved å fokusere på lokale healere og bruk av medisinsplanter. Blant annet forskes det på toksisitet av planter i bruk i tillegg til at det utvikles såkalte improved traditional medicines som er forbedrede formuleringer av tradisjonelle medisiner. Disse selges gjennom lokale apotek. DMT ligger under Malis folkehelseinstitutt og har siden 1990-tallet samarbeidet med både verdens helseorganisasjon (WHO) og Universitetet i Oslo (Diallo og Paulsen 2000, NUFU 2006).

7.4. Feltarbeid

I løpet av januar og februar 2006 ble det gjennomført intervjuer med totalt 45 healere i Dioila- og Kolokani-området i Mali. Henholdsvis 29 og 16 healere ble intervjuet i de to områdene. Intervjuene ble gjennomført på lokale språk, hovedsakelig bambara, og oversatt til engelsk av tolk og intervjuer, Drissa Diallo. Healerene ble spurt om indikasjon for bruk, tilberedning og dosering av følgende planter: *Combretum glutinosum*, *Erythrina Senegalensis*, *Terminalia macroptila*, *Anogeissus leiocarpus* og *Syzygium guineense*. Denne oppgaven vil kun omfatte resultater for sistnevnte plante.

7.4.1. Healerintervjuer i Kolokani

Resultatene fra healerintervjuer i Kolokani er presentert i Tabell 7.1. Av 16 healere var det kun to som brukte *S.guineense*. Det var flere som kjente til planten, men brukte den ikke og var heller ikke kjent med bruksområder for den. Dette skyldtes hovedsakelig at den ikke vokste i området. De to som benyttet seg av planten, brukte den for til sammen fire forskjellige indikasjoner. Dekokt av blader ble brukt mot malaria, generell smerte og uvelhet, mens rot var forsøkt brukt som afrodisium. Blad kunne også alternativt benyttes pulverisert og blandet med grøt eller vann. I dette området var *koa kissa* det vanligste navnet på *S.guineense*.

Tabell 7.1 Resultater fra healerintervjuer i Kolokani

Healers navn, alder og dialekt	Landsby	Opplysninger om praksis	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Samba Diarra 51 år Bambara	Diecouma, 40 km fra Kolokani	4-5 pasienter/dag		
Kassoum Traore 56 år Bambara	Fra Tao- Tomo Bor i Kolokani	5-7 pasienter/dag, men store variasjoner		
N'golo Coulibaly 67 år Bambara	Fra Seabougou Bor/jobber i Kolokani	5-6 pasienter/dag		
Koncoura Diarra (k) 63 år Bambara	Fra Sido Bor/jobber i Kolokani	3-5 pasienter/dag		
Sékou Tangara 67 år	Fra Yangasso Jobber i Kolokani	3 pasienter/dag		
Ouéna Kéita 71 år Bambara	Safiné- bougou Landsby 17 km fra Kolokani			
Famory Traoré 46 år Bambara	Sébecouro, 5 km fra Kolokani	5-10 pasienter/dag		
Tiégnery Diarra 52 år Bambara	Tiénégné- bougou 4 km fra Kolokani	5-15 pasienter/dag President i healer- forbundet		
N'gokoura Traoré (k) 72 år	Kolokani	Inntil 4 pasienter/dag Spesialist på	Malaria Generell smerte Uvelhet	Blad. 4 bunter. Dekokt. 1 glass drikkes x3 (etter mat). Evt. pulverisert blad. 1 ts blandes med grøt eller vann og spises/drikkes.

		behandling av barn		
Moussa M. Kéita 50 år	Fra Kangaba, bor og jobber i Kolokani	2-3 pasienter/dag Jobber i healer-forbundet	Malaria Afrodisium	Blad. Dekokt. Barnet drikker 2-3 håndfuller av morens hånd i 3 dager. Rot. Forsøkes brukt. Foreløpig ingen resultater.
Namassé Traoré 55 år	Kolokani	5 pasienter/dag		
Wori Coulibaly (k) > 60 år	Fra Tao-Tomo Bor og jobber i Kolokani	Store variasjoner		
Namasson Kané Ca 58 år	Falaka, 7 km fra Kolokani	4 pasienter/dag		
Fassey Konaré 65 år	Zorokoro, 5 km fra Kolokani	> 20 års praksis 5-10 pasienter/dag		
Tiéwari Diarra > 60 år	Sébécoro, 5 km fra Kolokani	Ca 20 års praksis 5 pasienter/dag		
N'Tio Traoré Ca 80 år	Tiouba-bougou	40 års praksis 20 pasienter per dag		

Forklaringer til Tabell 7.1 og Tabell 7.2:

Glass	Glass nr 8 (verre 8), rommer ca 75 ml
Dekokt	Plantematerialet varmes på flamme i en leirvase (<i>canari</i>) i en mengde vann i en gitt tid.
<i>Canari</i>	Halvt gresskar, brukes til vask og dampbad.
3(4)	Antall enheter for henholdsvis menn og (kvinner).
Tre-, femfingerklype	Mål for pulverisert plantemateriale. Indikerer antall fingre brukt som en "klype".
x1, x2, x3	Antall ganger daglig. Dosene fordelt utover dagen, x2 betyr morgen og kveld.
(k)	Kvinnelig healer

7.4.2. Healerintervjuer Dioila

Resultatene fra healerintervjuene i Dioila er presentert i Tabell 7.2. Av totalt 39 healere brukte 19 *S.guineense* for til sammen 29 forskjellige indikasjoner. De hyppigst nevnte indikasjonene var sår (4), dermatose (3) og malaria (3). I tillegg ble seks forskjellige indikasjoner nevnt av to healere. Blader var hyppigst brukt, deretter kom stammebark og rot. Kun én healer brukte rotbark og frukt i sin praksis. Av blader ble det stort sett brukt dekokter, mens rot, rotbark og frukt hovedsakelig ble tørket og pulverisert.

I begynnelsen av intervjuene i Dioila-området viste det seg vanskelig å finne det lokale navnet på *S.guineense*. Planten vokste flere steder i området, men det var tydelig at navnet som ble brukt der var et annet enn de intervjueren kjente til. Da det etter hvert ble brakt på det klare at det lokale navnet var *koffing*, lot det seg ikke gjøre å reise tilbake og gjøre intervjuene om igjen. Bruken av *S.guineense* i Dioila-området kan derfor være noe mer utbredt enn resultatene fra intervjuene viser.

Tabell 7.2 Resultater healerintervjuer Dioila

Healerens navn, alder og dialekt	Landsby	Opplysninger om praksisen	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
N'Golo Sidibé, 46 år, Bambara	Dioila	5 pasienter per dag. Har praktisert i 15 år		
Sidibé 54 år, Bambara	Dioila	5-7 pasienter per dag	<p>Magesmerter</p> <p>Svimmelhet</p> <p>Diabetes</p> <p>Magesmerter</p> <p>Ryggsmerter (lumbago)</p> <p>Søvnløshet</p> <p>Svakt barn</p>	<p>Rot. 1 ts pulver rett i munnen. Svelges m/litt vann.</p> <p>Rot. 1 tofingerklype pulver sniffes, kan evt. blandes med litt vann og fukte tøyestykke. Noen dråper klemmes ut av tøyestykket i nesa.</p> <p>Rot. 1 ts pulver. Dekokt (3 glass, 15-20 min). 1 glass drikkes morgen.</p> <p>Stammebark. Pulver blandes med pulver fra hirseskall og <i>Sesamum incanum</i> (frø). 1 ts spises.</p> <p>Stammebark. Bruker pulver til å tegne en ”+” på ryggen.</p> <p>Stammebark. 1 ts pulver rett i munnen. Svelges med vann.</p> <p>Rot. En trefingerklype pulver blandes med 2 håndfuller innhold fra kumage. Tørkes og pulveriseres. 2 glass av blandingen. Dekokt (4 l). 1 ts spises og kroppen vaskes daglig i 1-3 måneder.</p>
Yamoussa Mariko, Bambara	Volomin	20 pasienter per dag. Har praktisert i 31 år.	For lykke/hell	Blad og stammebark. 7 bunter blad. Dekokt. ”Litt” drikkes hver dag i 7 dager.
Dramone Mariko, 80 år, Bambara	Fignana	>4 pasienter per dag.		
Matenin Fomba, 80 år, Bambara	Fignana	10 pasienter per dag. Praktisert i 52 år. Hovedsakelig barn/spedbarn		

Mamoutou Togola, 54 år, Bambara	Fignana	5 pasienter per dag. Har praktisert i 16 år.		
Sina Mariko, 50 år, Bambara	Fignana	3-4 pasienter daglig. Har praktisert i 6 år.		
Madou Diakité, 64 år, Bambara	Fignana	4-5 pasienter per dag. Har praktisert i ca 20 år (siden faren døde).		
Sédo Fané, Ca 65 år, Bambara	Fignana	Jobber som smed i tillegg		
Moumini Mariko, 53 år	Fignana	Har praktisert i 10 år. Har annen jobb ved siden av.		
Mariam Traoré, 57 år, Bamabara	Diana	10 pasienter per dag. Har praktisert i 5 år.		
Somaila Diakité, 60 år, Bambara	Fignana	10 pasienter per dag. 50 års erfaring.	Brystsmterter Smerter i "belte-regionen" Hodepine Mange sykdommer hos spedbarn	Blad. 3 bunter. Dekokt ("lunge"). Bad/vask og dampbad. Drikkes ikke.
Sidi Konaté, 65 år, Bambara	Sirima-bougou	5-10 pasienter per dag. Praktisert i 10 år. Spesialist på barne-sykdommer.	Febermareritt hos barn Magesår	Blad. 1 bunt. Dekokt (1 l, 1 t). 2 ts drikkes x1 og vask/bad i 4 dager. Blad. Samme bruk som over. Rotbark. Tørkes og pulveriseres. Blandes med salt. 1-2 trefingerklyper rett i munnen x2.
Sirima Brama Konaté, 60 år, Bambara	Sirima-bougou	5-6 pasienter per dag. Praktisert i 10 år.	Onde ånder	Blad og stammebark. Dekokt. Bad/vask.
Zoumana Konaté 63 år, Bambara	Sirima-bougou	5-8 pasienter per dag. 30 års erfaring.	Smerter i belteområdet og leddsmerter	Blad. 3 bunter. Dekokt (2 l, oppkok). Bladene appliseres lokalt. Bad/vask og 2 glass av løsningen

			Inflammasjon	drikkes i 3 dager. Blad. Varmes litt på flamme (uten vann). Spises og appliseres lokalt på inflammasjon x1 i 4 dager.
N'Pie Mariko, 101 år, Bambara	Dinkoro			
Zantkoura Mariko, >50 år, Bambara	Dinkoro	5-6 pasienter per dag. 20 års erfaring	Dermatose Vaginit – "leminimpo"	Stammebark. 1 håndfull. Dekokt (4 l, til fargeforandring). Bad/vask og 2 håndfuller drikkes i 3-5 dager.
Mi Dagnoko, 98 år, Bambara	Falakonon	40 pasienter per dag. 70 års erfaring	"Indre sykdommer" (eks. forgiftning) "Gamle sår"	Blad. 3(4) bunter. Dekokt (full gryte, oppkok). Bad/vask og 1 håndfull drikkes i 7 dager. Stammebark (øst og vest). Pulver. 1 trefingerklype i grøt hver morgen Stammebark. Pulver appliseres på sår.
Nianzon Togola, >70 år, Bambara	Falakonon	5 pasienter per dag. 50 års erfaring.	Nakkesmerter	Blad. 3(4) bunter m/karitésmør. Dekokt (nok til å dekke buntene). Appliseres lokalt i 6 dager.
Soungalo Tiero, 50 år, Bambara	Falakonon	4 pasienter per dag. 30 års erfaring.	Sår	Frukt, blad og stammebark. 1 håndfull blader og 2 håndfuller stammebark. Dekokt (1 l, 20 min). Såret vaskes. Pulverisert frukt appliseres på såret hver morgen.
Fotigui Dagnoko, 39 år, Bambara		Fortsatt lærling under sin far. 15 års erfaring.	Malaria	Blad. 1 bunt. Dekokt (1 l, ca 20 min). Bad/vask og ½ l drikkes hver morgen i 7 dager.
N'Zan Sangaré, 46 år, Bambara	Foukala	20 pasienter per dag. 6 års erfaring.	Malaria	Blad og stammebark. 4 bunter blad og så mye stammebark man finner. Dekokt (2 l, 4 t). Bad/vask og ¼ l drikkes x1 i 1 uke
Mamou Traoré (k), 55 år, Bambara	Nizama	3-4 pasienter per dag. 4 års erfaring. Spesialist i barne- sykdommer	Små sår Dermatose	Blad. 3(4) bunter. Dekokt (4 l, 2 t). Bad/vask og ½ l drikkes x1 i 3 dager.
Adama Sanogo, 70 år, Bambara	Adama- bougou	10 pasienter per dag. 20 års erfaring.	Sykdom man ikke kan diagnostisere	Blad. 3 bunter. Dekokt ("nok", 4 t). Bad/vask x1 i 1 uke.
Tièblé Tioro, 80 år, Bambara	Dontiguila			

Korotoumo Ballo (k), 50 år, Bambara	M'pedjan	4 pasienter per dag.	Barnediare m/sort avføring	Blad. 3 bunter. Dekokt (4 l, 4 t). Bad/vask og 3 håndfuller drikkes x2 i 2 dager.
Bafing Togola, 55 år, Bambara	Yiriba-bougou	7 pasienter per dag. 10 års erfaring.	Munnsår Dermatose (små bobler i huden som blir til sår)	Blad. 3 bunter. Dekokt (4 l, oppkok). Brukes til munnvask Blad. 3 bunter. Dekokt (4 l, oppkok). Bad/vask x2 i 2 dager
Fatoguma Fomba, 91 år, Bambara	N'galla	60 års erfaring.	Urolig søvn Afrodisium	Blad. 3 bunter blad. Dekokt (4-5 l). ¼ l drikkes og ½ l blandes i badevannet x2 til man er "frisk". Rot (østvendt). Forkullet pulver blandes med salt, ingefær og geitepenis (tørket og pulverisert). 1 trefinger i grøt eller varmt vann, drikkes/spises kveld.
Salia Togola, 70 år, Bambara	Diana	5 pasienter per dag. 30 års erfaring.	Forstoppelse	Stammebark. 1 femfingerklype. Dekokt (3 glass, 15-20 min). 1 glass drikkes morgen.

8. Konklusjon

Målet i denne oppgaven var todelt. Polysakkarider fra *S.guineense* skulle isoleres og undersøkes med hensyn på karbohydratinnhold, struktur og aktivitet i biologiske systemer. I tillegg skulle det gjennomføres etnofarmakologiske studier i Mali bestående av healerintervjuer.

Vandige rækstrakter fra *S.guineense* viste til dels høy aktivitet sammenlignet med PM II-standarden i komplementfikseringstester. Videre isolering og opprensing ved gelfiltrering på Bio-Gel[®] P6 DG, ionebytter kromatografi med DEAE Sepharose[®] Fast Flow og gelfiltrering på Sephacryl S-400 viste at aktiviteten i stor grad var knyttet til de høymolekylære, sure polysakkaridfraksjonene. Av nøytrale fraksjoner var det kun Sg100N som ble testet for komplementaktivitet. Fraksjonen viste lav aktivitet.

Analyse av karbohydratinnhold og bindingsforhold viste innhold av vanlige pektiske monosakkarider. De sure fraksjonene Sg50A1, Sg50A2, Sg100A1 og Sg100A3 inneholder trolig store og komplekse hårete områder bestående av rhamnogalakturenanhovedkjeder med AG II-sidekjeder av nøytrale Gal- og Rha-enheter. Sg100A2 og Sg100A3 inneholder i tillegg trolig homogalakturenanområder i større grad enn de andre fraksjonene. For den nøytrale fraksjonen er rimelig å anta at arabinan, i tillegg til galaktaner, utgjør store deler av polysakkaridene.

Enzymatisk degradering med endopolygalakturenanase av de mest rensede og mest aktive fraksjonene ga noe redusert i aktivitet i komplementsystemet. Analyse av karbohydratinnhold og bindingsforhold tydet på at enzymene hadde hatt liten effekt. For videre analyser kan det være interessant å benytte et annet enzym til degradering. Arabinofuranosidase spalter ikke-reduserende Ara-ender og kunne trolig egnet seg bedre i forhold til polysakkaridenes sammensetning.

Sure fraksjoner fra 50 °C og 100 °C vannekstrakt viste å øke utskillelse av NO fra makrofager. Responsen var doseavhengig og tyder på makrofagstimulerende egenskaper. Fraksjonen fra 50 °C viste høyest aktivitet.

Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold for Sg50A og Sg100A viste et eddiksyreinnhold på henholdsvis $> 16,5 \%$ og $> 1,2 \%$ i forhold til totalt GalA-innhold. Metanolinnhold lot seg ikke bestemme da metoden viste seg uegnet. For videre analyse kan det tenkes at en metode som benytter seg av GC-analyse kunne fungert bedre.

Av 45 healere i Kolokani- og Dioila-området brukte 21 *S.guineense* i sin praksis. Av 33 indikasjoner for bruk var sår, dermatose og malaria hyppigst nevnt. Blader var vanligst i bruk, foran stammebark og rot.

9. Referanser

Africa-Expedition. Mali Map. http://www.africa-expedition.com/images/ct/mali_rel94.jpg (29.10.06),

Africare. Mali Map. www.africare.org/about/where-we-work/mali/map.gif (29.10.06),

AmershamBiosciences, Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400, S-500 High Resolution. I Instruction Manual 2003.

AmershamPharmaciaBiotech, PD-10 Desalting columns. I Instruction manual.

Bio-RadLaboratories, Bio-Gel P Polyacrylamide Gel. I Instruction Manual Hercules, CA.

Bruneton, J., Carbohydrates. I *Pharmacognosy : phytochemistry medicinal plants*, Intercept: London, 1999; Vol. 2, pp 33-35.

Burkhill, H., *The Useful Plants of West Tropical Africa*. The Trustees of Royal Botanic Gardens: Kew, 1997; Vol. 4.

Chambers, R. R. E. og Clamp, J. J. R., An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem J.* **1971**, 125, (4), 1009–1018.

CIA. The World Factbook - Mali.

<https://cia.gov/cia/publications/factbook/geos/ml.html> (29.10.06),

Ciucanu, I. og Kerek, F., A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **1984**, 131, (2), 209-17.

Cox, P. og Balick, M., The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American* **1994**, 6, (270), 82-87.

Diallo, D. og Paulsen, B., Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. I *Responding to bioprospecting : from biodiversity in the south to medicines in the north*, Svarstad, H.; Dhillon, S. S., Eds. Spartacus: Oslo, 2000.

- Djoukeng, J. D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A. L.; Bouda, H. og Lontsi, D., Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 101, (1-3), 283-286.
- Fujihara, M.; Muroi, M.; Tanamoto, K.-i.; Suzuki, T.; Azuma, H. og Ikeda, H., Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics* **2003**, 100, (2), 171-194.
- Gordon, S., Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell* **2002**, 111, (7), 927-930.
- Greibrokk, T., Eksklusjonskromatografi (gelkromatografi). I *Kromatografi*, UNIVERSITETSFORLAGET AS: Aurskog, 1998a; pp 80-100.
- Greibrokk, T., Ionebytterkromatografi. I *Kromatografi*, UNIVERSITETSFORLAGET AS: Aurskog, 1998b; pp 60-69.
- Heinrich, M. og Gibbons, S., Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2001**, 53, (4), 425-432.
- Heumann, D. og Roger, T., Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* **2002**, 323, (1-2), 59-72.
- Hokputsa, S.; Gerddit, W.; Pongsamart, S.; Inngjerdigen, K.; Heinze, T.; Koschella, A.; Harding, S. E. og Paulsen, B. S., Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 56, (4), 471-481.
- Kim, J. og Carpita, N., Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology* **1992**, 98, (2), 646-653.
- Kiyohara, H.; Yongwen, Z. og Yamada, H., Effect of exo--d-(1 -> 3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic

arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa *Carbohydrate Polymers* **1997**, 32, (3), 249-253.

Lea, T., Komplementsystemet. I *Basal og klinisk immunologi : prinsipper og molekylære mekanismer* Bergen, 2000; Vol. 2, pp 26-37.

Levigne, S.; Thomas, M.; Ralet, M.-C.; Quemener, B. og Thibault, J.-F., Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards *Food Hydrocolloids* **2002**, 16, (6), 547-550.

Liljebäck, T., Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards IProcedure Farmasøytisk Institut, UiO: 2006; p 11.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. og Parker, J., Essentials of Immunology. I *Brock Biology of Microorganisms*, Carlson, G., Ed. Pearson Education, Inc.: Upper Saddle River, NJ, 2003; pp 757-785.

Michaelsen, T. E.; Gilje, A.; Samuelsen, A. B.; Hogasen, K. og Paulsen, B. S., Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* **2000**, 52, (5), 483-490.

Nergård, C.; Kiyohara, H.; Reynolds, J.; Thomas-Oates, J.; Matsumoto, T.; H, Y.; Patel, T.; D, P.; Michaelsen, T.; D, D. og BS, P., Structures and structure-activity relationships of three mitogenic and complement fixing pectic arabinogalactans from the malian antiulcer plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (1), 71-79.

Nergård, C. S.; Matsumoto, T.; Inngjerdengen, M.; Inngjerdengen, K.; Hokputsa, S.; Harding, S. E.; Michaelsen, T. E.; Diallo, D.; Kiyohara, H.; Paulsen, B. S. og Yamada, H., Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydrate Research* **2005**, 340, (1), 115-130.

Niare, A. Etude de la Phytochimie et des Activités Pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Université de Bamako, Bamako, Mali, 2006.

NUFU. Medicinal plants in Mali.: Ethnobotany, Phytochemistry and Biological activity. <http://fm.siu.no/NufuProjects/FMPro?-db=project.fp5&-format=projectdetalj.htm&-lay=presentation%5fweb&-sortfield=title&programID=NUFU&partner%20%3a%3acountry=Mali&partner%20%3a%3auniName=University%20of%20Oslo&subjectArea%3a%3amainLookUp=%22%22&-max=10&-recid=32771&-find=> (29.10.06),

Paulsen, B. og Barsett, H., Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science* **2005**, (186), 69-101.

Paulsen, B. S., Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current Organic Chemistry* **2001**, 5, (9), 939-950.

Perez, S.; Rodriguez-Carvajal, M. A. og Doco, T., A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **2003**, 85, (1-2), 109-121.

Pharmacia-Biotech, DEAE Sepharose(r) Fast Flow. I Instruction Manual.

Promega Corporation, Griess Reagent System. I Technical Bulletin *INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930*, Promega Corporation: Madison, WI, 2005.

Rasmussen, K., Gasskromatografi. I *Kromatografi*, Aurskog, 1998; pp 109-153.

Samuelsen, A. B.; Paulsen, B. S.; Wold, J. K.; Otsuka, H.; Kiyohara, H.; Yamada, H. og Knutsen, S. H., Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* **1996**, 30, (1), 37-44.

Schepetkin, I. A. og Quinn, M. T., Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* **2006**, 6, (3), 317-333.

Schultes, R., Amazonian ethnobotany and the search for new drugs. I *Ethnobotany and the search for new drugs*, Chadwick, D. J.; Marsh, J., Eds. Wiley: Chichester, 1994; pp 106-112.

Sigma-Aldrich. Enzymatic Cell Lysis and Protoplast Preparation. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/22940/Plant-Cell-Wall.jpg> (01.11.06),

- Smith, C., Carbohydrate Biochemistry. I *Plant biochemistry and molecular biology*, Lea, P. J.; Leegood, R. C., Eds. Wiley: Chichester, 1999; Vol. 2, pp 105-118.
- Stephen, A. M., Other Plant Polysaccharides. I *The Polysaccharides*, Aspinall, G. O., Ed. Academic Press: New York, 1982; Vol. 3, pp 124-132.
- Sturgeon, R. J., Monosaccharides. *Methods in Plant Biochemistry* **1990**, 2, 1-37.
- Sweeley, C. C.; Bentley, R.; Makita, M. og Wells, W. W., Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (16), 2497-2507.
- Taiz, L. og Zeiger, E., Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. I *Plant Physiology*, Sinauer Associates: Sunderland, 1998; Vol. 2, pp 409-424.
- Taiz, L. og Zeiger, E., Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. I *Plant Physiology*, Sinauer Associates: Sunderland, 2002; Vol. 3, pp 313-328.
- Tesfaye, G.; Teketay, D. og Fetene, M., Regeneration of fourteen tree species in Harenn forest, southeastern Ethiopia. *Flora (Jena)* **2002**, (197), 461-474.
- Tsakala, T. M.; Penge, O. og John, K., Screening of in vitro antibacterial activity from *Syzygium Guineense* (Willd) hydrosoluble dry extract. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **1996**, 54, (6), 276-279.
- United-Nations-Development-Program. Country Fact Sheets - Mali.
http://hdr.undp.org/statistics/data/country_fact_sheets/cty_fs_MLI.html (29.10.06),
- Voragen, A. G. J.; Daas, P. J. H. og Schols, H. A., Enzymes as tools for structural studies of pectins. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* **2000**, 44, (Bioactive Carbohydrate Polymers), 129-145.
- Wagner, H.; Kraus, S. og Jurcic, K., Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources. *Immunomodulatory Agents from Plants* **1999**, 1-39.

Yamada, H.; Hirano, M. og Kiyohara, H., Partial structure of an anti-ulcer pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydrate Research* **1991**, 219, 173-192.

Yamada, H. og Kiyohara, H., *Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs*. Basel, 1999; p 161-202.

Yamada, H.; Nagai, T.; Cyong, J. C.; Otsuka, Y.; Tomoda, M.; Shimizu, N. og Gonda, R., Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, Plantago-mucilage A, from the seed of *Plantago asiatica*. *Carbohydrate Research* **1986**, 156, 137-45.